UNIVERSITÉ DE PARIS - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1961-1962 Série E, N°

THÈSES

présentées à la

FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du

GRADE DE DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Roland PERLÈS

Pharmacien-Chef des Etablissements Nationaux
Chef de Travaux délégué à la Faculté de Pharmacie de Paris

Première Thèse

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES GRAINES DE SORGHO

Deuxième Thèse

Proposition donnée par la Faculté

LES CARBOXYLESTÉRASES

Soutenues le *1962, devant la Commission d'Examen*

JURY { Messieurs M. M. JANOT, Président
J. E. COURTOIS, Professeur
P. MALANGEAU, Professeur

DACTYLO-SORBONNE
8, Rue Casimir-Delavigne
PARIS-VI°
1962

Errata

p. 8, ligne I7, lire : I8,2 et 22,5
p. I3, ligne 3, lire : ammoniaco-magnésien
p. I8, dernière ligne, supprimer : de
p. 33, ligne 7, lire : les graines
p. 39, ligne [illegible], lire : emmagasiné
p. 52, ligne 4 en bas, lire : ou
p. 63, ligne 6, lire : pelotonné
p. 8I, ligne 7 du bas, lire : d'incubation
p. I22, ligne I, lire : observées
p. I22, ligne 4, supprimer : 1
p. I46, dernière ligne, lire : phospholipides
p. I68, Référence II6, lire : Blayo

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538128_0001

UNIVERSITÉ DE PARIS - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1961-1962

Série E, N°

THÈSES

présentées à la

FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du

GRADE DE DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Roland PERLÈS

Pharmacien-Chef des Etablissements Nationaux
Chef de Travaux délégué à la Faculté de Pharmacie de Paris

Première Thèse

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES GRAINES DE SORGHO

Deuxième Thèse

Proposition donnée par la Faculté

LES CARBOXYLESTÉRASES

Soutenues le *1962, devant la Commission d'Examen*

JURY — Messieurs M. M. JANOT, Président
J. E. COURTOIS, Professeur
P. MALANGEAU, Professeur

DACTYLO-SORBONNE
8, Rue Casimir-Delavigne
PARIS-VI°
1962

R. U. Utr.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM.	G. VALETTE	Doyen
	M.M. JANOT	Assesseur
	L. RODINEAU	Secrétaire Général
	L. JEANDEL	Secrétaire Général-Adjoint
Mme	S. CERTAIN	Secrétaire
Mme	M.L. ESPINASSE	Secrétaire

DOYEN HONORAIRE

M.	René FABRE	Membre de l'Institut

PROFESSEURS HONORAIRES

MM.	René FABRE	Membre de l'Institut
	DELEPINE	Membre de l'Institut
	LAUNOY	
	FLEURY	
	MASCRE	
	PICON	
	BEDEL	

PROFESSEURS

MM.	M.M. JANOT	Pharmacie galénique (T)
	G. VALETTE	Pharmacodynamie (T)
	R. PARIS	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T)
	M. GUILLOT	Physique (T)
	J. GAUTIER	Chimie organique (T)
Mlle	S. LAMBIN	Microbiologie (T)
MM.	Y. RAOUL	Physiologie (T)
	J. COURTOIS	Chimie biologique (T)
	L. DOMANGE	Chimie minérale (T)

MM.	P. CRETE	Botanique (T)
	R. TRUHAUT	Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
	A. MORETTE	Hydrologie (T)
	R. CAVIER	Parasitologie (T)
	A. QUEVAUVILLER	Hygiène et Education sanitaire
	R. MOREAU	Pharmacie chimique (T)
	J. GUY	Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques (T.P.)
	A. GERMAN	Virologie et sérologie (T.P.)
	M. PIETTE	Biologie sanguine (T.P.)
	P. MALANGEAU	Chimie analytique (T)
	M. GIRARD	Chimie appliquée à l'expertise (T)
	G. DILLEMANN	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
	G. DEYSSON	Cytologie végétale (T.P.)
	J. FLAHAUT	Minéralogie (T.P.)
	C. BOUDENE	Professeur sans chaire
	A. Le HIR	Professeur sans chaire
	J. RENAULT	Professeur sans chaire

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	P. LARUELLE	Physique
	G. Le MOAN	Toxicologie
	P. ROSSIGNOL	Pharmacodynamie
	H. RENAULT	Pharmacie chimique
	G. PAOLETTI	Sciences appliquées
	A. MANGEOT	Chimie analytique
	P. DELAVEAU	Biologie végétale
	P. REYNAUD	Sciences physico-chimiques
	A. DESVIGNES	Microbiologie
	F. PERCHERON	Biochimie
	J. SAVEL	Sciences naturelles
	J. BORY	Sciences naturelles
	Y. COHEN	Sciences naturelles
	J. POISSON	Sciences naturelles

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	P. BINET	Parasitologie
	P. GESTEAU	Physique biologique
	J. GOUNELLE	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (section biologie)
	J. HARISPE	Chimie générale et pharmaceutique
	J. HENRY	Chimie (4ème année)
Mme	J. HUBERT	Microbiologie
MM.	R. LELUC	Microbiologie
	M. LEMONNIER	Chimie analytique (2ème et 3ème années)
Mlle	S. LONGUEVALLE	Service des examens de chimie
MM.	F. PELLERIN	Chimie analytique (2ème et 3ème années)
	R. PERLES (F.F)	Chimie biologique
	J. PESTIS (F.F)	Biologie animale
	P. POULLAIN	Hématologie
	J. RIVET (F.F)	Physique
Mme	M. ROBERT	Sérologie
Mlles	A. ROLLEN	Biologie végétale
	L. SEGUIN (F.F)	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (section Physico-chimique)
Mme	H. SELLER (F.F)	Pharmacie galénique industrielle
M.	J. YONGER (F.F)	Chimie analytique (lère année)

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

M.	A. CAVE	Chef de travaux de pharmacotechnie galénique
Mlle	H. MORIN	Chef de travaux de pharmacodynamie
M.	ROBBA	Chef de travaux de pharmacotechnie chimique

BIBLIOTHEQUE

Mlle	Y. RUYSSEN	Conservateur, chargée de la Direction
Mlle	LAVAUD	Conservateur
Mmes	DESGRIPPES	Bibliothécaire
	KREHMER	Bibliothécaire

A Monsieur le Professeur P. FLEURY

Professeur Honoraire à la Faculté de Pharmacie de Paris

Pharmacien en Chef Honoraire des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine

Membre de l'Académie Nationale de Médecine

Officier de la Légion d'Honneur

Qui nous a accuelli dans son Laboratoire, nous a associé à certains de ses travaux et a toujours suivi nos recherches avec intérêt.

Hommage de très respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur M.M. JANOT

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

Assesseur du Doyen de la Faculté de Pharmacie de Paris

Co-Directeur de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du Centre National de la Recherche Scientifique

Membre de l'Académie Nationale de Médecine

Chevalier de la Légion d'Honneur

Qui nous a prodigué ses encouragements et nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre Jury de Thèse.

En témoignage de profond respect.

A notre Maître Monsieur le Professeur J.E. COURTOIS

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

Pharmacien des Hôpitaux de Paris

Chevalier de la Légion d'Honneur

Qui nous a initié à la recherche et nous a fait l'honneur de nous choisir pour Assistant, ne nous ménageant jamais ses conseils et ses encouragements.

En témoignage de notre très respectueuse affection et de notre profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur P. MALANGEAU

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

Pharmacien en Chef des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine

Qui a accepté de faire partie de notre Jury de Thèse et nous a fait profiter de ses conseils amicaux et éclairés.

En témoignage de notre très sincère attachement.

A Carol et Thierry.

A mon Père et à ma Mère.

A mes Frères.

A mes amis.

CONTRIBUTION A L'ETUDE BIOCHIMIQUE DES GRAINES DE SORGHO

INTRODUCTION

-:-

A notre entrée au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Pharmacie de Paris alors dirigé par le Professeur P. FLEURY, notre Patron d'Internat, le Professeur J.E. COURTOIS qui à l'époque occupait la Maîtrise de conférences attachée à la chaire, nous proposa de rechercher une méthode commode pour déterminer le méso-inositol dans les milieux complexes. Par ce moyen il devait être possible d'entreprendre une étude de ce cyclitol dont le manque de réactivité chimique constituait un sérieux obstacle pour en suivre le sort dans les organismes vivants. Il nous fut suggéré de tenter le dosage de cette substance en appréciant les quantités d'acide glycolique qu'elle fournit lorsqu'on lui fait subir l'oxydation periodique. Nous relaterons au cours de notre travail les raisons qui nous conduisirent à abandonner cette idée. Quelques temps après, à la suite d'une mission en Afrique Occidentale, le Professeur COURTOIS à qui il avait été demandé de procéder à une étude biochimique des graines de Sorgho et de Mil, base de l'alimentation des populations noires de cette région nous proposa d'orienter nos recherches

sur ces Graminées. Il nous invita à nous consacrer plus spécialement à l'examen des substances intervenant dans le métabolisme phosphoré de ces graines. Notre effort s'est porté sur l'acide phytique dont on connaissait les propriétés rachitigènes et sur les phytases susceptibles d'hydrolyser ce composé en donnant de l'acide orthophosphorique et du méso inositol. Ces dernières molécules qui sont indispensables au fonctionnement des organismes vivants animaux et végétaux faisaient depuis longtemps l'objet de diverses recherches poursuivies dans ce Laboratoire. Le travail que nous présentons se propose d'apporter quelques informations relatives à la composition de ces graines et aux modifications qui affectent certains de leurs constituants lorsqu'elles sont soumises à la germination.

Avant d'exposer les résultats rassemblés dans cette étude nous désirons exprimer notre profonde gratitude et notre respectueux attachement au Professeur P. FLEURY qui nous a accueilli dans son Laboratoire, nous a associé à certaines de ses recherches et a toujours suivi avec intérêt l'ensemble de nos travaux.

Notre initiation à la recherche scientifique est l'oeuvre du Professeur J.E. COURTOIS. Attaché à son service hospitalier en qualité d'Interne, ses conseils et ses encouragements nous incitèrent à embrasser les carrières de Chercheur, d'Universitaire et de Pharmacien des Hôpitaux. Notre

Internat achevé, il fut notre Directeur de Recherches au C.N.R.S. et lorsqu'il prit possession de la Chaire de Chimie Biologique, il nous manifesta une fois de plus sa confiance et son estime en nous permettant de devenir son Assistant. Qu'il soit assuré de notre très affectueuse reconnaissance et de notre entier dévouement. Nous remercions Monsieur le Professeur M.M. JANOT qui a bien voulu accepter de présider notre Jury. Il nous a fait l'honneur de nous compter au nombre des Collaborateurs de la Collection des Précis de Pharmacie dont il assume la direction. Ses encouragements en diverses circonstances nous ont été des plus précieux. Nous lui exprimons notre respectueuse gratitude. Nous sommes heureux de remercier le Professeur P. MALANGEAU qui a accepté de faire partie de notre Jury. Nous avons eu le plaisir de lui succéder au poste d'Assistant lorsqu'il devint Maître de Conférences de Chimie Biologique. Il a toujours suivi nos recherches avec un vif intérêt et nous avons pu bénéficier de son expérience et de ses précieux conseils. Son amitié nous est chère et envers lui va notre affectueuse gratitude.

-:-

PLAN DU TRAVAIL

-:-

Notre travail est divisé en quatre parties :

Première Partie : Elle est consacrée aux déterminations du phosphore total, du phosphore acido-soluble et du phosphore phytique de douze échantillons de Mils et de Sorghos. La composition de ces graines alimentaires est comparée à celles d'autres Graminées cultivées sous nos climats. La teneur en calcium et magnésium de quelques-unes de ces graines est ensuite examinée, ce qui permet de formuler quelques remarques relatives à des problèmes d'hygiène alimentaire, l'acide phytique étant doué de propriétés décalcifiantes.

Deuxième Partie : Elle est réservée à l'étude enzymologique des graines de Mils et de Sorghos. Les activités glycérophosphatasique et phytasique des graines avant et après germination y sont étudiées. L'absence d'activité phytasique dans les graines non germées nous a conduit à tenter le démasquage de la phytase par deux procédés. Dans les graines germées l'activité glycérophosphatasique est accrue tandis qu'apparaît l'activité phytasique. Un bref examen de l'activité amylasique et β glucosidasique termine cette deuxième partie.

Troisième Partie : Les variations des diverses fractions phosphorées de la graine et celles de l'inositol libre et combiné au cours de la germination constituent la matière de cette partie.

Quatrième Partie : Elle se propose d'exposer les recherches entreprises sur la fraction lipidique des graines de Sorgho. Le fractionnement partiel des lipides totaux a permis de déceler dans les produits d'hydrolyse de la fraction céphalinique des phospholipides : du méso-inositol, lequel doit provenir du clivage d'un ou plusieurs inositophosphatides présents dans la graine.

-:-

PREMIERE PARTIE

LE PHOSPHORE DES GRAINES DE MILS ET DE SORGHOS

CHAPITRE I

-:-

ETUDE DE LA TENEUR EN PHOSPHORE PHYTIQUE DES GRAINES DE SORGHOS ET DE MILS

-:-

Les graines de Sorgho et de Mil constituent la base de la ration alimentaire de plusieurs centaines de millions d'humains et assurent la majorité des besoins caloriques des populations noires d'Afrique Occidentale. Elles entrent sous des formes diverses dans la confection de nombreuses préparations culinaires : farines, bouillies, crèmes, sauces, couscous, pains, galettes, etc... Leur contenu glucidique les fait utiliser aussi dans la fabrication de boissons fermentées. Les graines de ces Graminées des régions chaudes se distinguent de celles de nos climats par la richesse en son de leurs farines. En effet, alors que dans le Blé l'enveloppe représente environ 25 p.cent du poids de la graine, pour le Sorgho la mouture fournit à peu près 40 p.cent de son. Ce taux élevé s'explique par la taille relativement petite des graines (les poids du grain sont en moyenne situés autour de : Maïs 500 mg, Blé, Avoine, Orge : 50 mg ; Sorgho 30 mg; Mil 7,5 mg). La composition chimique du grain entier de Sorgho déterminée par HUBBARD, HALL et EARLE (87) oscille autour

des valeurs ci-dessous, mais les variations que l'on peut constater à la lecture des mémoires présentent parfois des écarts considérables (+)

	g par 100 g de graine fraîche
Cendres	1,65
Protéines	12,3
Lipides	3,6
Amidon	73,8

La teneur en eau suivant les échantillons est comprise entre 9 et 14 p.cent g de grain frais. En dehors des valeurs concernant le phosphore total, il n'existe pas à notre connaissance de travaux consacrés aux proportions relatives des diverses combinaisons phosphorées. D'après ADRIAN (1), le phosphore total des graines de Mil représente 9,6 p.cent du poids des cendres et pour le Sorgho de 13,4 à 20,4 p.cent selon les auteurs. Les travaux personnels d'ADRIAN fournissent des valeurs comprises entre 18,2 à 22,5 p.cent pour les Sorghos de l'Ouest Africain. Rapporté à 100 g de grain frais, le phosphore du Sorgho du Sénégal oscille entre 251 mg (Sorgho indigène) et 470 mg (Sorghum cernuum). Pour le Mil

---

(+) Le taux de cendres p.cent grammes de Sorgho est compris, suivant les auteurs, entre 0,8 et 3,15. Le taux de phosphore des cendres oscille entre 13,4 et 22,5, celui de calcium entre 0,85 et 1,55 et celui de fer entre 0,045 et 1,47 g p.cent de cendres. De telles différences incitent à considérer ces résultats avec une certaine prudence.

(Pennisetum sp) ADRIAN admet les taux de 303 à 404 mg.

Dans ce chapitre après avoir décrit les techniques analytiques utilisées nous donnerons les résultats de nos examens relatifs à la distribution du phosphore phytique dans un certain nombre d'échantillons de graines de Mils et Sorghos du Sénégal. Les valeurs trouvées seront comparées à celles d'autres Graminées alimentaires de nos pays.

Matériel

Les diverses graines de Sorgho et de Mil étudiées nous ont été obligeamment procurées par le Professeur Th. MONOD, Directeur de l'Institut Français d'Afrique Noire (I.F.A.N.) à qui nous désirons exprimer notre vive gratitude. Les échantillons avaient été rassemblés par M. P. PELISSIER, Chef de la section de Géographie de l'I.F.A.N. que nous sommes également heureux de pouvoir remercier ici. Les graines provenaient du pays sérère, Diohiné, subdivision du Siné (Sénégal). Les échantillons sont parvenus à Paris sous forme d'épis ou de panicules entiers ; ils correspondaient d'après les identifications effectuées à Dakar aux genres, espèces et variétés suivants :

Petit Mil ou Mil chandelle : Pennisetum sp

Sanio n°1	Tardifs
Sanio n°2	
Souna n°3	Hâtifs
Souna n°4	
Souna n°5	

Sorgho ou gros Mil : Sorghum

Teing ou Nteing n°6, probablement S. gambicum, Snowden

Kongossan n°7 probablement S. guineense.Stapf

Voyendé n°8 probablement S. guineense, var.

Mboratel n°9 S. cernuum. Host.

Féla blanc n°10 S. cernuum. Host.

Féla blanc jaunâtre n°11 S. cernuum. Host.

Féla rouge n°12 S. cernuum. Host.

Ainsi qu'on peut le voir l'identification exacte n'a pas toujours pu être faite avec toute la précision souhaitable. En effet la classification des Sorghos et Mils est extrêmement complexe. SNOWDEN (132) a identifié 31 espèces de Sorghos auxquelles correspondent 157 variétés et plus de 600 formes. On connaît par ailleurs une centaine de variétés du genre Pennisetum. La multiplicité des noms vernaculaires ne facilite pas les déterminations précises ; il existe parfois une centaine de noms pour désigner une même espèce et ce en Afrique noire seulement. PIEDALLU (117), ADRIAN (1).

Dès leur réception au laboratoire les graines ont été séparées des épis et panicules, nettoyées et dépoussiérées puis conservées dans des récipients hermétiquement bouchés. Au cours de notre travail nous avons du nous procurer de nouveaux échantillons par l'intermédiaire de l'I.F.A.N.; certains de ces échantillons étaient d'une qualité inférieure

à celle du premier envoi ; ils provenaient des marchés indigènes et leur conservation n'avait pas fait l'objet de soins particuliers. Quelques lots étaient parasités et les graines hébergaient une variété de charançon. Pour de tels lots, nous avons procédé au triage des graines à la pince, éliminant systématiquement les graines endommagées qui s'écrasaient facilement sous la pression de la pince. Le charançon selon CREAC'H (51) est le principal ennemi des Sorghos stockés, il peut causer des dégâts considérables dans les graines entreposées. Le parasite consomme de préférence le germe et les parties tendres et respecte en général les grains cornés.

Au moment des essais analytiques, les graines très dures ont été pulvérisées le plus finement possible au moyen d'un broyeur électrique "Turmix". La pulvérisation des graines peu avant l'examen chimique se montre préférable à la pulvérisation effectuée à l'avance: BIGWOOD (20) a en effet observé que dans les graines de Blé pulvérisées, dont on conserve la farine trois ou quatre semaines, le taux d'acide phytique subit des modifications notables. Ce taux tend paradoxalement à augmenter. BIGWOOD qui s'attendait à trouver une diminution de la teneur en acide phytique dans les farines résultant d'une mouture réalisée quelques semaines auparavant, a au contraire pu constater une élévation de la teneur en acide phytique, au point que cette substance peut dans certains cas représenter jusqu'à 100 p.cent du phospho-

re total. Ce fait est assez étonnant, car la mouture devrait favoriser les contacts entre la phytase de la graine et son substrat. L'hypothèse d'une meilleure extractibilité de l'acide phytique dans les échantillons pulvérisés vieillis a été suggérée mais l'auteur reconnaît que cette explication n'est pas entièrement satisfaisante.

Techniques

Détermination du phosphore total

L'acide orthophosphorique est libéré de ses combinaisons par minéralisation sulfonitrique de la matière organique puis déterminé colorimétriquement sous forme de complexe phospho-molybdo-vanadique jaune.

0,25 g de poudre de graines sont placés dans un matras de Kjeldahl, on ajoute 2 ml d'acide sulfurique et 5 ml d'acide nitrique purs. On porte au bain-marie bouillant pendant une dizaine de minutes puis on élève progressivement la température jusqu'à ébullition en chauffant le matras à feu nu sur une rampe de Kjeldahl. L'ébullition est maintenue environ 4 heures. Le liquide est alors incolore ou légèrement teinté de jaune par des traces de peroxyde d'azote difficiles à éliminer. Après refroidissement le contenu du matras est additionné de 10 ml d'eau distillée et porté une dizaine de minutes au bain-marie bouillant. Cette opération a pour but d'hydrolyser les acides polyphosphoriques susceptibles d'avoir

pris naissance au cours de la minéralisation, EBEL (59).

L'acide orthophosphorique est alors précipité sous forme de sel ammoniaco-magnésium par addition de mixture magnésienne et d'ammoniaque jusqu'à franche alcalinité à la phénolphtaléine. Le précipité qui se forme est recueilli sur filtre en papier après 24 heures de séjour au réfrigérateur, lavé à l'eau ammoniacale puis solubilisé au moyen d'une solution d'acide nitrique dilué à 10 p.cent en volumes. La solution récoltée dans une fiole jaugée est complétée à 25 ml avec les eaux de lavage du filtre. Sur une partie aliquote de la solution ainsi obtenue, on dose l'acide orthophosphorique par la technique de Misson en utilisant le protocole opératoire décrit par FLEURY et LECLERC (67). La technique de Misson repose sur le principe suivant : en présence de vanadium pentavalent et de molybdène hexavalent, l'acide orthophosphorique fournit en milieu nitrique de normalité comprise en 0,2 et 1,5 N un complexe jaune phospho-méta-vanado-molybdique de formule probable $PO_4(NH_4)_3$, $VO_3\ NH_4$, 16 Mo O_3. La coloration se développe assez rapidement et atteint son maximum en une dizaine de minutes. La teinte jaune se prête à une mesure photométrique que l'on effectue en se plaçant à la longueur d'onde de 430 mμ . Une courbe de référence est établie au moyen d'une solution aqueuse de phosphate monopotassique. Cette courbe peut être assimilée à une droite pour des concentrations en phosphore comprises entre 0 et 500 μg

(exprimé en $P_2 O_5$) dans la prise d'essai.

Détermination du phosphore acido-soluble

Les composés phosphorés acido-solubles au sein desquels se trouve l'acide phytique sont extraits par une solution d'acide trichloracétique. COURTOIS et BARRE (8) ont observé en effet que les combinaisons acide phytique-protéines normalement présentes dans les graines sont dissociées par l'acide trichloracétique qui insolubilise en même temps la fraction protéique. Les solutions d'acide chlorhydrique préconisées par divers auteurs, lorsqu'elles sont trop peu concentrées ne parviennent pas à provoquer la dissociation de la combinaison acide phytique-protéine ; de ce fait une partie de l'acide phytique demeure insolubilisée et échappera au dosage. Par contre, lorsque l'on met en oeuvre des solutions d'acide chlorhydrique de concentration trop élevée, on assiste à la mise en solution non seulement de l'acide phytique mais aussi de la protéine. Cette dernière entravera par la suite la précipitation de l'acide phytique sous forme de phytate ferrique. Ces remarques conduisent à réaliser l'extraction du phosphore total acido-soluble de la manière suivante : 2,5 g de farine de graines à analyser sont mis en suspension dans un flacon à large ouverture renfermant 25 ml de solution à 20 p.cent en poids d'acide trichloracétique. Après obturation du récipient avec un bouchon de verre rodé,

on soumet à une agitation mécanique pendant trois heures à la température du laboratoire. Le mélange est ensuite centrifugé. La phase surnageante est mise de côté et le culot est traité à nouveau par 5 ml de solution trichloracétique dans les mêmes conditions. Les deux extraits acides sont réunis et le volume est amené à 50 ml. L'extraction trichloracétique réalisée à froid n'entraîne pas le phosphore lipidique (en partie lié aux protéines) ni le phosphore nucléoprotéique. Vers 90° les solutions trichloracétiques solubilisent le phosphore nucléoprotéique. Sur une prise d'essai de 10 ml, nous dosons le phosphore après minéralisation sulfo-nitrique en suivant le même protocole que pour le phosphore total.

Détermination du phosphore phytique

De nombreuses méthodes ont été préconisées pour le dosage de l'acide phytique des graines, la plupart se basant sur l'insolubilisation de cet acide sous forme de sels de calcium, baryum, cuivre, ou fer. Nous avons retenu la technique de COLIN (28) modifiée par MAC-CANCE et WIDDOWSON (100). Elle consiste à isoler l'acide phytique sous forme de phytate de fer insoluble, facile à recueillir, et dont la minéralisation permet la détermination de l'acide phosphorique. Une étude critique des méthodes de dosage de l'acide phytique et en particulier des variantes utilisant la formation de phytate de fer a été publiée par BIGWOOD (20). Cet auteur

considère que la méthode au fer constitue le procédé le plus sûr pour déterminer l'acide phytique, en ce sens qu'il évite le mieux la coprécipitation du phosphore étranger à l'acide phytique. C'est également l'opinion défendue par ESSERY (61).

Nous pratiquons le dosage du phosphore phytique d'après le mode opératoire qui suit : une partie aliquote de l'extrait trichloracétique de l'opération précédente est neutralisée par la soude en présence de rouge de méthyle et acidifiée ensuite à pH 5,0 par quelques gouttes d'acide trichloracétique.

Le virage du colorant est parfois très difficile à saisir en raison du fait que certains échantillons de Sorgho se montrent particulièrement riches en une matière colorante rouge intense en milieu acide fort, verdâtre en milieu alcalin. Les indigènes savent d'ailleurs tirer parti de cette matière colorante naturelle qu'ils utilisent pour la teinture du cuir en particulier (mil des teinturiers). Il est important de se trouver en milieu suffisamment acide pour deux raisons en milieu peu acide le phosphate ferrique précipite, en milieu alcalin l'acide trichloracétique serait décomposé, en donnant naissance à du chloroforme lors du chauffage.

Après ajustage du pH, on ajoute au milieu 0,5 ml de solution de thiocyanate d'ammonium à 10 % et l'on porte quelques secondes à l'ébullition. Dans le milieu on ajoute alors goutte à goutte une solution au dixième de chlorure ferrique

officinal à 26 p.cent jusqu'à ce qu'un léger excès donne une teinte rouge franc de thiocyanate ferrique. On laisse refroidir 30 minutes et recueille le précipité par centrifugation. Le précipité est remis en suspension dans 5 ml d'acide chlorhydrique N/10 destiné à solubiliser le phosphate ferrique. Nous soumettons à une nouvelle centrifugation et jetons le surnageant. Après un nouveau lavage par ce procédé et centrifugation, le surnageant est éliminé, les dernières traces du liquide étant absorbées avec du papier filtre. Le tube à centrifuger est séché à l'étuve et le précipité que l'on récupère est alors minéralisé par le mélange sulfonitrique, l'acide phosphorique libéré étant dosé par la même méthode que précédemment.

Détermination des orthophosphates

Les orthophosphates sont déterminés directement sur la liqueur d'extraction trichloracétique. La solution acide est additionnée d'un excès de mixture magnésienne et d'ammoniaque jusqu'à alcalinité à la phénolphtaléine. Le précipité gélatineux qui se forme renferme le phosphate ammoniaco-magnésien ainsi que les sels insolubles de l'acide phytique. Après 24 heures de séjour au réfrigérateur le précipité est recueilli sur un filtre en papier. Il est solubilisé au moyen d'une solution au dixième d'acide nitrique. On complète le filtrat jusqu'à obtenir 15 ou 25 ml de solution finale et dose l'acide orthophosphorique par la méthode de Misson selon FLEURY

et LECLERC (67). Cette technique permet en effet la détermination de l'acide orthophosphorique en présence d'acide phytique. Nous l'utilisons pour l'étude des phytases peu actives.

Détermination des orthophosphates par la méthode de Copaux. (29)

Nous utilisons cette méthode rapide lorsque nous savons que nos prises d'essais finales renfermeront au moins 5 mg d'acide orthophosphorique (exprimé en $P_2 O_5$). Elle est commode pour la détermination de l'activité glycérophosphatasique des graines. Son principe est le suivant : en milieu acide, l'acide orthophosphorique donne avec le molybdate de sodium en présence d'éther et d'eau, un complexe liquide dense, jaune, séparable par centrifugation dans une ampoule spéciale graduée. Ce complexe a une composition constante dans des conditions opératoires déterminées et son volume est tel que 1/20 de ml correspond sensiblement à 1 mg de $P_2 O_5$ (soit 0,436 mg de P ou 1,38 mg de $PO_4 H_3$).

Résultats et Discussion

Teneur des diverses graines de Mil en composés phosphorés.

Les résultats obtenus ont été groupés dans le tableau 1. Ils représentent le nombre de milligrammes de phosphore sous diverses formes contenus dans 100 g de poudre de graines. L'examen des valeurs qui figurent dans ce tableau permet de

de formuler un certain nombre de remarques.

a) Teneur en phosphore total :

Dans le groupe des cinq petits Mils, la teneur en phosphore total présente peu de variations d'une espèce à l'autre. Dans le cas des Sorghos, les écarts sont par contre plus accentués. Ainsi l'échantillon de Teing renferme environ 2,5 fois plus de phosphore que le Féla blanc jaunâtre. Pour les autres échantillons, les différences sont beaucoup moins marquées ; exception faite du Teing, les valeurs sont comprises entre 240 et 340 mg p.100 g. La variété Teing était peut être parasitée de façon inapparente de sorte qu'une partie du contenu phosphoré utilisée par le parasite a pu subir des transformations en modifiant la nature. Les teneurs en phosphore total des genres Pennisetum et Sorghum sont du même ordre de grandeur que celles des autres graines utilisées dans l'alimentation ainsi qu'il est possible de s'en rendre compte à l'examen du tableau II qui groupe des résultats obtenus par G. BERTRAND et SILBERSTEIN d'après D. BERTRAND (18) et JAVILLIER (90), par MAC-CANCE et WIDDOWSON (101) et ceux fournis par DEMOLON et MARQUIS (55).

Il est aisé de constater à la lecture de ce tableau que la teneur en phosphore total est assez variable pour un même genre selon les différents auteurs : de 260 à 494 pour l'Avoine, de 308 à 480 pour le Blé. Les écarts rencontrés pour les différentes espèces soumises à notre analyse sont du

Tableau I

Teneurs en phosphore total, acido-soluble et phytique de divers échantillons de graines de Mils et Sorghos

Nature de l'échantillon	PETIT-MIL				
	sanio 1	sanio 2	souna 3	souna 4	souna 5
P. total	264	284	318	367	327
P. acido-soluble	188	144	241	288	284
P. phytique	177	129	236	284	281

Nature de l'échantillon	SORGHO						
	Teing 6	Kongossan 7	Voyendé 8	Mboratel 9	Fela blanc 10	Fela blanc jaunâtre 11	Fela rouge 12
P. total	611	314	340	337	375	240	339
P. acido-soluble	382	300	334	288	255	192	330
P. phytique	368	273	316	260	242	181	317

Tableau II

Teneur en phosphore total de quelques graines de graminées en mg p.100 g de matière sèche

Nature de l'échantillon	Auteurs (références bibliographiques)			
	(18)	(90)	(101)	(55)
Avoine		260		328 à 494
Blé	415	453		308 à 480
Maïs	234	260	363	218 à 308
Orge		466		386 à 430
Riz			350	284 à 350
Seigle	492	412		394 à 480

même ordre de grandeur que ceux observés pour les autres Graminées.

b) Teneur en phosphore phytique

On peut remarquer que le phosphore phytique constitue la majeure partie du phosphore organique et du phosphore acido soluble de nos échantillons. Le tableau III montre que suivant les graines examinées le phosphore phytique représente 45 à 93p.100 du phosphore total.

Tableau III

Pourcentage de P phytique par rapport au P total de la graine

Sanio 1	Sanio 2	Souna 3	Souna 4	Souna 5	Teing	Kongossan	Voyendé	Mboratel	Fela blanc	Fela blanc jaunâtre	Fela rouge
67	45,5	74,2	77,5	86,0	60,2	87	93	77,2	64,5	75,5	93,5

Si on calcule le pourcentage de phosphore phytique par rapport au phosphore acido-soluble extractible à l'acide trichloracétique, on est conduit à formuler les observations qui suivent :

I°- Le phosphore phytique constitue pour tous nos échantillons la presque totalité du phosphore acido-soluble. Ce taux qui est de 89 p.cent pour la variété Sanio 2 où le rapport est le plus faible atteint 98 p.cent pour les trois variétés de Souna examinées.

2°- Les teneurs en acide phytique, ainsi que le rapport $\frac{\text{Phosphore phytique}}{\text{Phosphore total}}$ varient assez nettement d'une espèce de Mil à une autre. Elles sont par contre peu différentes entre les variétés d'une même espèce comme c'est le cas pour les trois Souna.

3°- Les proportions de phosphore phytique par rapport au phosphore total d'autres Graminées alimentaires sont du même ordre de grandeur avec parfois cependant des écarts assez nets d'une graine à l'autre pour un même genre et d'une espèce à une autre ou d'une variété à une autre. Les différences souvent notables que l'on peut rencontrer dans la littérature à propos d'un même genre peuvent partiellement s'expliquer par le fait que les auteurs utilisent des techniques assez diverses pour déterminer l'acide phytique et également en raison de l'imprécision que l'on constate dans les mémoires quant à l'identification exacte de la variété agricole analysée.

PEERS (112) estime que le phosphore phytique du grain de Blé représente 70 à 75 p.cent du phosphore total. D'après COMMON cité par BIGWOOD (20), les valeurs fournies par le Blé sont de 66 à 77 p.cent ce qui est en accord avec les résultats obtenus par MAC CANCE, WIDDOWSON, MORAN et Collab. Par contre BAILEY (5) admet la valeur nettement inférieure de 57 p.cent pour le Blé.

PEREZ (113) qui s'est attaché plus spécialement à

l'examen des Blés d'origine tunisienne a constaté que pour les Blés tendres appartenant à quatre variétés différentes la teneur en acide phytique était comprise entre 145 et 177 mg pour 100 g de graines avec une moyenne de 160 mg. Pour les Blés durs, la teneur en acide phytique est apparue sensiblement plus élevée, s'étageant entre 183 et 220 mg avec une moyenne de 190 mg. MOLLGAARD, LORENZEN, HANSEN et CHRISTENSEN (106) ont donné pour le Blé une valeur nettement supérieure: 273 mg. Pour le Maïs, on peut relever les teneurs en phosphore phytique suivantes : 210 mg (MAC CANCE et WIDDOWSON), (101)) ; 199 à 270 (MOLLGAARD (106)) ; 294 (COURTOIS et PEREZ (36)). SANDEGREN (129) a aussi observé de légères différences entre les diverses variétés d'Orge et il a également pu déceler des écarts assez marqués entre les teneurs d'échantillons de la même variété cultivés sur des sols différents en Suède.

Dans le cas de nos échantillons de Mil et de Sorgho à l'exception du lot de Sanio n°2 qui présentait une teneur en acide phytique relativement faible il est permis de conclure que la teneur en ce constituant ne distingue guère ces graines de celles des autres Graminées alimentaires.

-:-

CHAPITRE II

-:-

RAPPORTS ENTRE LES TENEURS EN CALCIUM ET MAGNESIUM DES GRAINES DE SORGHOS ET MILS ET LEUR CONTENU EN ACIDE PHYTIQUE

-:-

Après avoir déterminé la teneur en acide phytique des graines de Sorgho et Mil, il nous a semblé intéressant de procéder au dosage du calcium et du magnésium contenus dans ces graines. En effet l'acide phytique a la propriété de donner avec les sels de calcium, de magnésium et de fer des phytates très peu solubles et très peu ionisés qui ne sont pratiquement pas résorbés par la muqueuse intestinale. Chez les animaux supérieurs, la plus grande partie des inosito-hexa-phosphates apportés par la ration alimentaire se retrouve dans les matières fécales. De la sorte une fraction importante du calcium, du magnésium et du fer ingérés devient inutilisable par l'organisme et cette insuffisance en certains éléments minéraux se traduit par des manifestations pathologiques. Il a ainsi été observé des carences calciques et martiales durant les périodes de guerre pendant lesquelles les populations et les enfants plus spécialement consommaient des farines à taux de blutage élevé. De tels régimes apportaient sous for-

me de son des quantités importantes d'acide phytique capable d'insolubiliser des ions minéraux indispensables. Ces carences ont retenu l'attention de nombreux biochimistes : MELLANBY, MAC-CANCE et WIDDOWSON en Grande-Bretagne, HOFF-JORGENSEN, PEDERSEN et NICOLAYSEN en Scandinavie etc... Plusieurs revues et en particulier celles de GUILLEMET (81) (82) DERIVAUX (57) et COURTOIS (39) (41) ont fait le point de la question. Un apport excédentaire d'acide phytique a été également rendu responsable de carences en magnésium, ROBERTS et YUDKIN (126) et en zinc O'DELL (110).

La flore intestinale des animaux supérieurs paraît devoir jouer un rôle important dans l'hydrolyse enzymatique de l'acide phytique, réaction qui conditionne l'utilisation des constituants de cette substance et de ses sels. COURTOIS et PEREZ (39) ont pu mettre en évidence dans les matières fécales humaines une phytase vraisemblablement d'origine bactérienne qui en milieu faiblement acide se montre assez active. Par la suite COURTOIS et MANET (42) montrèrent que le colibacille représentant typique de la flore intestinale possède une phytase très active en milieu acide. Chez les Ruminants l'abondance de la flore du tube digestif explique que les phytates puissent être absorbés en quantité parfois très importante. C'est ainsi que chez le Mouton, la flore du rumen assure un taux de résorption des phytates atteignant 90 p. cent de celui des phosphates. Dans cette résorption, la part

des phytases d'origine végétale alimentaire est considérée comme négligeable contrairement à ce que l'on observe chez les non-ruminants. RAUN et Collab. (124) HILL et TYLER (86). C'est le cas du Porc qui grâce au concours des phytases végétales du régime effectue l'hydrolyse de l'acide phytique au niveau de l'estomac. L'hydrolyse intestinale ne devient appréciable que si la ration est supplémentée en phosphate tricalcique et non en carbonate de calcium. L'élévation du pH intestinal dœ à cette dernière substance n'est en effet pas favorable à l'action des phytases bactériennes, MOORE et TYLER (107). Chez l'Homme, lorsque l'acide phytique alimentaire est excédentaire comme cela s'est produit durant la dernière guerre, il est cependant possible de pallier les risques de carences minérales en ajoutant aux farines une certaine proportion de carbonates de calcium et de fer. L'utilisation de graines à forte activité phytasique assurant au cours de la panification l'hydrolyse quasi-totale de l'acide phytique a aussi été préconisée. Ce procédé élégant présente l'avantage de fournir à l'organisme des phosphates et de l'inositol facilement utilisables.

Le but du travail exposé dans ce chapitre a été d'examiner si l'acide phytique des graines de Sorgho et de Mil se trouvait ou non en excédent par rapport aux quantités de calcium et de magnésium qu'il est susceptible de bloquer. Car à supposer qu'il existe une activité phytasique dans les grai-

nes, celle-ci doit disparaître au cours de la cuisson des farines.

Détermination du calcium et du magnésium des graines

Cette détermination est effectuée sur les graines pulvérisées. Dans une capsule de platine, on calcine 1 g de poudre de graines jusqu'à obtenir des cendres presque blanches. Ces cendres sont reprises par 2 ml d'acide chlorhydrique normal et on laisse digérer pendant 15 minutes sur le bain-marie bouillant. Après refroidissement de la solution, on transvase dans un bécher et l'on ajoute les eaux de rinçage de la capsule jusqu'à obtenir environ 15 ml de solution. Sur cette solution on va procéder au dosage de la somme calcium + magnésium puis à celui du magnésium selon des techniques complexométriques faisant usage du sel disodique de l'acide éthylène-diamine tétra-acétique (complexon III).

a) Dosage du bloc calcium-magnésium

La solution précédente est neutralisée par 2 ml de soude normale puis amenée à forte alcalinité. Habituellement dans les dosages de calcium et magnésium par le complexon III, l'on opère entre pH 9 et 10 en ajoutant au milieu une solution tampon à base de chlorure d'ammonium et d'ammoniaque. Ici un tel tampon paraît peu souhaitable car la présence dans les cendres de phosphates risquerait d'entraîner la précipitation de phosphate ammoniaco-magnésien. Un tampon au borate

a été préconisé par BETZ et NOLL (19) qui permet d'éviter l'élimination des phosphates lorsque ceux-ci ne sont pas trop abondants et que le milieu est suffisamment dilué. Ce tampon répond à la formule suivante :

Tétraborate disodique cristallisé à 10 H_2O ..... 40 g

Soude en plaques ..... 10 g

Sulfite neutre de sodium anhydre (+) ..... 5 g

Eau distillée q.s.p. ..... 1000 ml

10 ml de ce tampon sont versés dans la solution à doser. On ajoute III gouttes d'une solution fraîche de Noir Eriochrome à 1 p.cent dans l'isopropanol. Les ions Ca^{++} et Mg^{++} libres communiquent à cet indicateur une teinte rouge. On procède au titrage au moyen d'une solution M/100 de complexon III (PM 372) jusqu'à virage du rouge au bleu, teinte qui indique que les deux métaux sont totalement complexés.

b) Dosage du magnésium

Sur une autre prise d'essai obtenue après minéralisation et solubilisation en milieu chlorhydrique on se débarrasse du calcium par précipitation sous forme d'oxalate. Pour ce faire la solution acide est amenée au voisinage de la neutralité par la soude normale sans dépasser pH 6 (papier indicateur Merck) on ajoute alors de l'acide acétique

---

(+) Le sulfite évite l'interférence du Fer et du Cuivre lors du virage de l'indicateur.

à 10 p.cent jusqu'à atteindre pH 4 environ, puis 2 ml d'une solution d'oxalate de potassium à 10 p.cent. On porte au bain-marie bouillant pendant 10 minutes puis laisse se poursuivre la précipitation pendant une heure à la température du laboratoire. La solution est filtrée sur un filtre sans cendres. Le filtrat renferme le magnésium en solution. Le précipité est lavé avec 10 ml d'eau très froide employée en plusieurs fois et l'on joint les eaux de rinçage au filtrat. Le magnésium de la solution est titré comme plus haut par le complexon III en présence de Noir ériochrome. Le calcium est évalué par différence entre les deux titrages.

Résultats et Discussion

Les résultats obtenus figurent dans le tableau IV.

Tableau IV

Teneurs en calcium, magnésium et phosphore phytique de trois espèces de Mils

Echantillon	Milliatomes de Ca dans 100 g	Milliatomes de Mg dans 100 g	Millimolécules d'acide orthophosphorique estérifié sous forme d'acide phytique, dans 100 g
Samo n°1	3	5	5,7
Sorgho Teing n°6	5	8	11,8
Sorgho Mboratel n°9	3,5	6	8,4

Il est habituellement admis que dans les graines l'acide phytique se trouve soit à l'état de sel de potassium soit surtout sous forme de sel mixte de calcium et de magnésium, chaque molécule d'acide phosphorique estérifié de l'acide phytique pouvant se combiner à un atome de calcium ou de magnésium. L'examen du tableau permet de se rendre compte que dans les trois espèces étudiées, l'acide phytique est en excédent par rapport à la quantité de calcium à laquelle il est théoriquement capable de s'unir. Par contre la somme des cations calcium et magnésium est légèrement excédentaire par rapport à la quantité nécessaire pour se combiner à l'acide phytique présent. Ainsi l'acide phytique est susceptible de bloquer la majeure partie mais non la totalité du calcium et du magnésium. Le taux de calcium des graines soumises à l'analyse s'avère un peu supérieur à celui trouvé pour d'autres Graminées croissant dans les régions tempérées. Par exemple pour le Sanio n°1, nous trouvons 120 mg pour 100 g de graines, pour le Sorgho Teing 200 mg et pour le Sorgho Mboratel 140 mg. FERRANDO (65) qui a examiné les teneurs respectives en phosphore et calcium de nombreux végétaux alimentaires indique les valeurs suivantes en mg de calcium pour 100 g : Avoine : 80, Orge : 50, Blé : 40 ; Seigle 40, Maïs 15 et attire l'attention sur le déséquilibre qui existe entre les teneurs élevées en phosphore de certaines de ces graines et leur pauvreté relative en calcium.

Ce déséquilibre entre le phosphore et le calcium risque encore de s'accroître en raison des propriétés insolubilisantes de l'acide phytique vis-à-vis des autres sources de calcium apportées par le régime. Certaines graines de Graminées se comportent de la sorte comme des aliments dangereux pour le maintien de l'équilibre phosphocalcique.

Dans les trois graines analysées, le léger excès de cations divalents par rapport à la quantité d'acide phytique ne laisse cependant théoriquement qu'une faible proportion de calcium utilisable. Le rapport P/Ca n'est en outre pas très favorable à une bonne assimilation puisque compris entre 1,9 et 2,3. La possibilité d'une hydrolyse phytasique lors de la pulvérisation des graines et de leur mélange avec de l'eau avant la cuisson ne peut pas être envisagée car nous verrons plus loin que les Mils et les Sorghos se classent parmi les graines dont l'activité phytasique est très restreinte. Ces divers arguments amènent à considérer qu'une alimentation où la part du Mil et du Sorgho est trop importante devrait entraîner des phénomènes de décalcification. En fait les populations de l'ouest africain ne paraissent pas présenter un nombre anormalement élevé de carences calciques. L'étude de la flore intestinale de ces peuples fournirait peut être des éclaircissements et l'action bénéfique de microorganismes intestinaux à phytases actives n'est pas à écarter a priori.

Les graines de Mils et Sorghos ne semblent pas posséder une teneur élevée en fer. Nous avons pu le constater au cours de quelques essais qualitatifs opérés par comparaison. Les cendres de la minéralisation réalisée par voie sèche, reprises par l'acide chlorhydrique normal ne produisent qu'une faible coloration rose lorsqu'on les additionne d'un excès de solution de thiocyanate de potassium à 10 p.cent. La teinte obtenue avec un échantillon de Mil et un échantillon de Sorgho est moins accentuée que celle fournie dans les mêmes conditions par l'Avoine et le Blé. Pour ces deux grains on admet une teneur en fer de 5 et 4 mg par 100 g de grain entier (123). D'après les valeurs relevées dans Adrian, le Mil paraît renfermer environ 2,5 mg de fer et le Sorgho 1 mg. La médiocrité de cette teneur en fer est une notion importante car ce métal, nous l'avons dit, peut être aisément insolubilisé par l'acide phytique. Il est cependant à remarquer que les populations qui vivent sur les terrains latéritiques riches en fer, comme c'est le cas des sols africains, ne présentent pas en général de carence martiale. Par ailleurs les sols tropicaux et équatoriaux se caractérisent par leur pauvreté relative en phosphore qui s'y rencontre en outre sous des formes peu mobilisables en raison de leur insolubilité au pH ambiant. Ces sols renferment de l'acide phytique apporté par l'enfouissement des végétaux verts utilisés comme engrais, VIGUIER (133). Cet acide phytique se fixe sur le fer et l'alu-

minium des sols latéritiques en donnant les phytates correspondants qui se montrent encore plus insolubles que ceux de calcium et de magnésium. Il s'en suit que le fer en quelque sorte insolubilisé sur place sera rendu très difficilement absorbable par la plante, FERRAND (64).

Le blocage éventuel de la faible proportion de fer existant dans la graine par l'acide phytique qu'elles renferment ne paraît pas susceptible d'engendrer des carences en cet élément, l'alimentation apportant par ailleurs d'autres sources de fer (eaux de boisson, légumes, aliments d'origine animale). Jusqu'ici les maladies de carence consécutives à la consommation de Mils et Sorghos n'ont été décrites que chez les individus dont la ration alimentaire est presqu'exclusivement constituée par ces céréales. Les troubles observés proviennent essentiellement d'une carence généralisée en vitamines et de la pauvreté de ce régime en tryptophane (dans le cas du Sorgho faiblement pourvu en cet acide aminé). La prévention et le traitement de ces carences consistent simplement en une réduction de la part des céréales dans le régime et une complémentation au moyen d'aliments d'origine animale, de légumes et de fruits.

-:-

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE QUELQUES ACTIVITES ENZYMATIQUES DU SORGHO ACTIVITES GLYCEROPHOSPHATASIQUE ET PHYTASIQUE EN PARTICULIER

CHAPITRE I

-:-

ETUDE DES ACTIVITES GLYCEROPHOSPHATASIQUE ET PHYTASIQUE DES GRAINES DE SORGHOS ET DE MILS

-:-

Les résultats exposés précédemment ont fait ressortir que l'acide phytique représentait le constituant phosphoré de beaucoup le plus abondant dans les graines examinées. Il nous a donc paru utile de procéder à l'étude des phytases, enzymes qui doivent assurer l'hydrolyse de l'acide phytique considéré comme une substance de réserve mise à contribution par la graine lors de son développement. La détermination des activités glycérophosphatasiques a été effectuée parallèlement afin de pouvoir établir la comparaison entre ces deux activités phosphatasiques.

Généralités sur la phytase (48)

On désigne sous le nom de phytase une phosphatase particulière qui possède la propriété d'hydrolyser l'acide phytique, conduisant finalement à la libération d'une molécule de méso-inositol et de six molécules d'acide orthophosphorique. Bien qu'assez peu répandue dans la nature, la phytase

est cependant à l'origine de la découverte des phosphatases. C'est en effet en 1906 que SUZUKI, YOSHIMURA et TAKAISHI décelèrent dans les céréales, un enzyme qui libère l'acide orthophosphorique à partir de l'acide phytique. La phytase se distingue des phosphatases alcalines d'origine animale et des phosphatases acides de graines et de feuilles par son action sur l'acide phytique car ces dernières se révèlent incapables de réaliser la scission hydrolytique de l'acide phytique.

Dans de nombreuses graines, il a été possible de mettre en évidence au moins deux activités phosphatasiques. L'une est rapportée à une phosphomonoestérase banale appartenant au type II de la classification de ROCHE et COURTOIS (127). Cet enzyme agit sur une gamme étendue de mono esters orthophosphoriques d'alcools ou de phénols (+); il se montre par contre incapable d'attaquer les esters penta-et hexaphosphoriques de l'inositol. Les esters tri- et tétraphosphoriques apparaissent déjà plus sensibles à l'action de l'enzyme tandis que l'acide inositol monophosphorique constitue un substrat aisément hydrolysable, COURTOIS et JOSEPH (33). L'autre activité phosphatasique des graines peut être attribuée à une phytase ou phytophosphatase, FLEURY et COURTOIS, (68) dont

---

(+) Le seul ester phosphorique de phénol naturel est la psilocybine, principe hallucinogène de certains champignons du Mexique du genre Psilocybe, son hydrolyse par les phosphatases a été récemment étudiée. HORITA (A.) et WEBER (L.J.)- Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 1961, 106, 32.

le pH optimum d'action est situé sensiblement dans la même zone que celui des phosphatases de type II, c'est-à-dire entre pH 5,0 et 5,6.

La phytase possède un champ d'action étendu : elle effectue l'hydrolyse des esters orthophosphoriques sensibles à l'action de la phosphomonoestérase banale et de plus scinde les esters penta- et hexaorthophosphoriques du méso-inositol. L'attaque de la molécule d'acide phytique par la phytase se réalise de façon progressive, les six fonctions esters n'étant pas rompues simultanément. Les radicaux phosphoriques se détachent les uns après les autres comme le démontrent les expériences de S. et Th. POSTERNAK (121). Après libération d'une première molécule d'acide orthophosphorique, l'hydrolyse de l'ester inositopentaphosphorique résultant se poursuit par l'attaque de la fonction ester située en position méta par rapport à l'hydroxyle libre du méso-inositol, COURTOIS et JOSEPH (35). La chromatographie sur papier a par la suite permis à DESJOBERT et PETEK (58) de déceler les cinq esters du méso-inositol qui apparaissent successivement au cours de l'hydrolyse de l'acide phytique par la phytase du son de Blé.

Au cours d'essais de purification des phytases de diverses graines (Blé, Seigle, Radis, Moutarde blanche etc..) au moyen des techniques de fractionnement par les sels ou par les solvants organiques, COURTOIS et Collab. (68) (30) (31) (32) (34) (15) ont pu réaliser la séparation de la frac-

tion correspondant à la phosphomonoestérase banale de celle douée d'activité phytasique.

Jusqu'ici il n'a pas été possible d'obtenir une fraction enzymatique agissant sur l'acide phytique mais dépourvue d'action sur l'acide β glycéro-phosphorique. A l'inverse il a toujours été donné de mettre en évidence dans les diverses graines une fraction hydrolysant les mono-esters orthophosphoriques mais à laquelle l'acide phytique se montre résistant.

Répartition de la phytase

La phytase est un enzyme dont la distribution est presqu'exclusivement localisée dans le règne végétal ; elle ne paraît se rencontrer que fort rarement chez les animaux.

Chez les végétaux supérieurs, ce sont les graines qui constituent le matériel le mieux pourvu en cet enzyme, encore qu'il existe des variations très considérables d'activité d'une graine à l'autre même au sein d'une même famille botanique. Alors que par exemple les graines de Blé et de Seigle renferment une phytase particulièrement active, d'autres graines de Graminées se distinguent par leur activité très restreinte voire nulle. C'est ce que l'on observe pour l'Avoine, le Dactyle ainsi que pour les différents Mils et Sorghos comme nous le montrerons plus loin. Pourtant dans toutes ces graines, l'acide phytique constitue la majeure partie du phos-

phore organique emmaganisé dans la graine, le phosphore minéral ne représentant qu'une faible proportion du phosphore acido-soluble. Il peut paraître au premier abord assez paradoxal que la réserve phosphorée la plus importante de la graine ne puisse chez certains végétaux être hydrolysée de façon appréciable faute d'un enzyme suffisamment actif pour l'attaquer. En fait les besoins de la graine en dormance sont très réduits et l'on constate en général une exaltation ou une apparition de l'activité phytasique dans les premiers stades de la germination.

En dehors des graines, les autres organes végétaux ne présentent qu'une activité phytasique minime voire nulle. Les feuilles sont pratiquement dépourvues d'activité à l'exception cependant de la feuille d'Epinard dont l'activité phytasique se révèle selon WILDMAN et BONNER (135) supérieure à l'activité β glycérophosphatasique.

Chez les animaux l'enzyme est très rare. La phytase ne se rencontre pas dans les sécrétions digestives des animaux supérieurs. Elle a été décelée dans la muqueuse intestinale du Rat, PILEGGI (118). Chez cet animal l'activité phytasique a été mise en évidence dans d'autres tissus ou organes : foie, rein, rate, cerveau, plasma. Chez les Oiseaux (Pigeon, Oie) le plasma présente une légère activité phytasique. Ce fait mérite d'être rapproché de l'existence d'acide phytique dans le sang de divers Oiseaux, LEVA et RAPOPORT (97)

mais tous ne paraissent pas capables d'utiliser l'acide phytique, GILLIS (78). Cependant le Poussin synthétise l'acide phytique à partir du méso-inositol et du phosphore organique marqués, HUNG (88).

Protocole d'étude des activités glycérophosphatasique et phytasique

Nous avons étudié l'activité glycérophosphatasique et phytasique des douze échantillons de graines de Mils et Sorghos en adoptant le protocole opératoire proposé par COURTOIS et PEREZ (36) et ce afin de pouvoir comparer nos résultats à ceux obtenus par ces auteurs avec diverses graines appartenant à des familles botaniques distinctes.

Cinq grammes de poudre fine de graines sont mis en suspension dans 100 ml d'eau distillée par trituration au mortier pendant quelques minutes. Le liquide obtenu, additionné d'une goutte de toluène comme antiseptique, est mis à macérer une heure au réfrigérateur à +4° puis soumis finalement à une agitation mécanique d'une heure à la température du laboratoire. Le mélange est centrifugé et la phase surnageante filtrée sur papier. La solution opalescente obtenue est utilisée comme préparation enzymatique dans nos essais d'activité.

Mesure des activités glycérophosphatasique et phytasique

La mesure de ces activités est effectuée en opposant la solution précédente à un substrat constitué par du glycérophosphate de sodium ou du phytate de sodium de telle sorte que la concentration finale soit égale à M/100, exprimée en acide orthophosphorique estérifié. L'essai est réalisé à pH 5,2 par l'emploi d'un tampon : acide acétique-acétate de sodium. Les détails opératoires sont relatés ci-dessous.

Dans une série de flacons stériles, on verse successivement :

- 5 ml de substrat constitué par du glycérophosphate de sodium ou du phytate de sodium de concentration M/10 en acide orthophosphorique estérifié et ajusté à pH 5,2 par addition d'acide acétique 2 N.
- 10 ml de solution tampon acide acétique-acétate de sodium M/2 de pH 5,2
- 5 ml de solution enzymatique de graines

Le volume final est amené à 50 ml par addition d'eau distillée toluènée.

Les flacons sont fermés au moyen de bouchons de liège recouverts de cellophane et mis à l'étuve à 37°, après avoir été agités.

Après un séjour de 24 heures ou 4 jours à l'étuve (en

prenant soin d'agiter quelques minutes chaque jour), la réaction enzymatique est arrêtée selon la technique de COURTOIS et PEREZ qui présente le double avantage de précipiter les protéines tout en introduisant dans le milieu une partie des réactifs ultérieurement nécessaires à l'isolement de l'acide orthophosphorique libéré. Pour ce faire, le contenu de chaque flacon est versé dans une fiole d'Erlenmeyer, on y ajoute en rinçant le flacon, 10 ml d'un mélange à parties égales d'acide acétique et d'acétate d'ammonium et 20 ml de mixture magnésienne aux nitrates (Nitrate d'ammonium 100 g, nitrate de magnésium 50 g, eau distillée q.s.p. 1000 ml). On agite et porte sur le bain-marie bouillant pendant une trentaine de minutes. On filtre ensuite sur papier pour éliminer les protéines floculées. Les filtres sont lavés avec quelques ml d'eau distillée chaude et les eaux de lavage sont jointes au filtrat.

Après refroidissement l'on ajoute à chaque fiole quelques gouttes de phénolphtaléine puis alcalinise fortement par addition d'ammoniaque pure à 20 % (Codex). On laisse précipiter le phosphate ammoniaco-magnésien par abandon des fioles durant 24 h au réfrigérateur. On poursuit ensuite le dosage de l'acide orthophosphorique par la méthode de Misson ou celle de Copaux ainsi qu'il a été indiqué dans la 1ère partie. Des valeurs obtenues dans ces mesures, on prend la précaution de retrancher la teneur en orthophosphates d'un

essai témoin réalisé en laissant, à 37° pendant 24 h ou 4 jours à pH 5,2, une solution de 5 ml de substrat amenée au volume final de 50 ml comme précédemment.

Résultats

Dans une première série d'expériences ne portant que sur un nombre limité d'échantillons, il nous a été permis de constater que les extraits enzymatiques de graines de Sanio I et Sanio 2, Mboratel et Fela rouge ne provoquent aucune libération d'acide orthophosphorique à partir de phytate de sodium comme substrat lorsque la durée d'incubation avec ce dernier est égale à 24 heures. Pour ces quatre graines, l'activité phytasique pouvant dans ces conditions opératoires être considérée comme nulle, nos essais ont été poursuivis en allongeant la durée du contact entre l'enzyme et le substrat ; celle-ci a été portée à 4 jours. Les résultats de ces expériences sont consignés dans le tableau V.

Tableau V

Activités glycérophosphatasique et phytasique de divers échantillons de mils

Nature de l'échantillon	PETIT-MIL				
	sanio 1	sanio 2	souna 3	souna 4	souna 5
Pourcentage d'hydrolyse du glycérophosphate	28,2	27,6	23,6	28,8	23,6
Pourcentage d'hydrolyse du phytate	<1	<1	<1	<1	<1

Nature de l'échantillon	SORGHO						
	Teing 6	Kon-gos-san 7	Vo-yen-dé 8	Mbo-ratel 9	Fela blanc 10	Fela bl. jau-nâ-tre 11	Fela rou-ge 12
Pourcentage d'hydrolyse du glycérophosphate	22,5	33,6	32,4	39,4	49,6	39,0	34,4
Pourcentage d'hydrolyse du phytate	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Discussion

L'examen des valeurs rassemblées dans le tableau nous suggère les remarques suivantes. Les extraits enzymatiques de toutes les graines de Pennisetum et de Sorghum soumises à

l'analyse possédent une activité glycérophosphatasique particulièrement nette. L'hydrolyse du glycérophosphate de sodium à la concentration finale M/100 est toujours supérieure à 20 p.cent, elle atteint une valeur maximale voisine de 50 p.cent pour le Sorgho Fela blanc.

D'une manière générale, l'activité glycérophosphatasique des Sorghum est notablement plus marquée que celle des graines de Pennisetum exception faite cependant pour le Sorgho Teing qui, de tous les échantillons analysés présente, l'activité glycérophosphatasique la plus faible. Ce lot s'était déjà distingué par sa forte teneur en phosphore total (1ère partie). Si nous procédons à la comparaison de nos résultats avec ceux obtenus par COURTOIS et PEREZ dans des conditions opératoires similaires, nous pouvons formuler les observations suivantes. Après 4 jours le Maïs réalise l'hydrolyse de 31 p.cent du β-glycérophosphate qui lui est opposé, cette valeur le place entre les Pennisetum et les Sorghum. Dans les mêmes conditions, l'Orge ne libère que 11,3 p.cent du phosphore du glycérophosphate, valeur au moins deux fois plus faible que celles obtenues avec une quelconque de nos graines. Pour le Blé et le Seigle, les résultats sont plus difficilement comparables car les durées d'incubation choisies par COURTOIS et PEREZ pour ces graines ne dépassent pas 48 heures : en 2 jours les Blés tendres hydrolysent 19 p.cent du glycérophosphate, les Blés durs, 23 p.cent, le Seigle

15 p.cent. Il est vraisemblable que pour une durée d'incubation de 4 jours les différents échantillons de Blé fourniraient des taux d'hydrolyse assez proches de ceux obtenus dans nos essais.

Les différences sont au contraire considérables en ce qui concerne l'activité phytasique. Après 24 heures de contact, nous avons déjà signalé l'impossibilité de déceler la moindre activité phytasique pour deux échantillons de Mil et deux échantillons de Sorgho. Il en a été de même après 4 jours d'incubation pour les 5 Mils et les 7 Sorghos dont nous disposions . La petite quantité d'acide orthophosphorique qui peut être déterminée dans le milieu représente toujours une valeur au plus égale à 1 p.cent du phosphore théoriquement libérable du phytate de sodium. Cette activité phytasique pratiquement nulle des Pennisetum et Sorghum dans ces conditions opératoires contraste avec les fortes activités qui caractérisent le Blé ou le Seigle. Les deux Graminées africaines doivent prendre place à côté des Graminées très faiblement actives de nos climats : Avoine, Maïs, Dactyle, Brome des prés.

-:-

CHAPITRE II

-:-

INFLUENCE DE LA GERMINATION SUR L'ACTIVITE PHYTASIQUE

-:-

Au moment où commence la germination, les diverses activités métaboliques de la graine jusqu'alors très réduites se réveillent et s'accroissent rapidement. Parmi les modifications qui caractérisent cette manifestation physiologique l'augmentation de l'activité phosphatasique s'est assez précocement signalée à l'attention des chercheurs qui avaient déjà pu observer que l'activité de l'amylase s'élève de façon très importante dans les premiers stades de la germination de l'Orge. C'est également l'étude de cette Graminée par H. et B. Von EULER (63) qui permit de mettre en évidence l'augmentation de l'activité phosphatasique dans les mêmes conditions. Le phénomène a par la suite été constaté par NEMEC (109) sur d'autres graines et de nombreuses recherches ont été entreprises ultérieurement avec différentes espèces. COURTOIS et PEREZ (37) ont pu montrer que dans le cas des graines de Radis, l'activité phosphatasique qui décroît les deux premiers jours de la germination subit ensuite un accrois-

sement marqué pour atteindre un plafond au cinquième jour. On s'est demandé, et en particulier dans le cas des graines à activité enzymatique restreinte, si l'augmentation d'activité résultait de la formation ex novo de protéines enzymatiques ou bien si l'enzyme préexistait dans la graine sous forme de précurseurs,ou encore était lié à un complexe insoluble. Ce complexe insoluble ainsi que le supposent SARMA et GIRI (130) libérerait l'enzyme au moment où débute la germination. Ces auteurs ont effectivement mis en évidence dans le Riz, le Soja et le Raji ou Mil des Indes (Eleusine coracana, Graminées), l'existence de deux phosphatases : l'une sous forme libre, l'autre étant liée. La fraction liée se distingue par le fait qu'elle ne peut être extraite par l'eau au voisinage de 0°. Une germination de 72 heures permet de faire passer dans l'eau la totalité de la fraction responsable de l'activité phosphatasique.

La germination s'accompagne également d'une augmentation de l'activité phytasique chez la plupart des graines ; il y a même apparition de cette activité chez certaines graines pour lesquelles elle n'avait pu être décelée avant germination. C'est le cas de l'Avoine examinée par ALBAUM et UMBREIT (3). Dans l'Avoine non germée, PEREZ (113) a seulement mis en évidence une très faible activité après 4 jours de contact entre la préparation enzymatique de graines et le substrat. La minime quantité d'acide orthophosphorique libé-

rée ne s'accroît pas lorsque le temps de contact est porté à 10 jours. Les graines d'Avoine utilisées par ANAGNOSTOPOULOS et LINO (4) au cours de leur étude sur l'activité phosphotransférasique se sont montrées complètement dénuées d'activité phytasique.

L'absence d'activité phytasique observée pour tous nos échantillons de Mils et Sorghos nous a incité à étudier l'influence de la germination sur l'activité phytasique.

Les essais ont été effectués sur trois variétés de Sorghum : Kongossan n°7, Mboratel n°9 et Fela blanc jaunâtre n°11. Comparativement nous avons procédé à la détermination de l'activité β-glycérophosphatasique.

Protocole opératoire

Cinq grammes de graines triées (afin d'éliminer celles qui sont brisées ou paraissent endommagées par des parasites) sont désinfectées par lavage au moyen d'une solution à 2 p. mille de sulfate d'orthohydroxyquinoléine. Les graines sont immergées pendant 10 minutes dans un bécher stérile renfermant la solution désinfectante. Le liquide est ensuite éliminé par décantation et les graines sont rincées avec de l'eau distillée bouillie refroidie à trois reprises au moins ; on vérifie qu'au dernier lavage, l'eau de rinçage ne fournit tout au plus qu'une légère teinte verte avec une solution diluée de perchlorure de fer (recherche du sulfate d'orthohy-

droxyquinoléine).

Les graines ainsi désinfectées et nettoyées sont disposées dans une boîte de Pétri sur un lit de coton hydrophile stérile humidifié à l'eau distillée stérile.

Ces précautions d'asepsie sont de première importance, les graines humides devenant très facilement un excellent support pour le développement des moisissures, surtout si le temps de germination dépasse 4 à 5 jours. Les moisissures qui croissent sur les graines tirent une partie de leurs matériaux nutritifs de ces dernieres. Ainsi GHOSH JABAT JIBAN (77) a pu montrer que les graines contaminées par les champignons accusent une nette diminution de leur teneur en acide phytique tandis que les moisissures s'enrichissent en cette substance. Les champignons appartenant aux genres Aspergillus, Penicillium, Fusarium et Mucor peuvent en effet croître sur un milieu dans lequel l'acide phytique constitue l'unique source de phosphore. Il est d'ailleurs démontré que certaines Aspergillacées et des préparations de Takadiastase renferment une phytase appartenant au groupe III des phosphatases.

La germination est réalisée en disposant les boîtes de Pétri à l'étuve à 37° pendant 2 à 4 jours. La température optimale de développement est de 33°, le maximum se situant à +40°. Le choix de la température de 37° pour nos essais est donc satisfaisant. A cette température relativement élevée la germination est très rapide et les tigelles peuvent

atteindre 5 à 8 cm de longueur en 4 jours. En général, bien que l'étuve elle-même ne soit pas stérile, les risques d'envahissement par les moisissures sont assez faibles en raison du temps de séjour limité imposé aux graines. Pour les périodes plus longues étudiées dans d'autres expériences de notre travail, les contaminations sont fréquentes et l'on doit souvent multiplier les essais afin de n'utiliser que des échantillons où la présence de champignons peut être considérée comme négligeable.

La totalité des graines soumises à la germination est recueillie. Dans chaque lot il y a toujours une certaine proportion de graines qui n'ont pas germé, le reste accusant un développement plus ou moins important. Si la quantité de graines stériles paraît dépasser environ 20 p.cent du lot initial mis en oeuvre, l'essai est recommencé.

La récolte est broyée au mortier et mise en suspension dans 100 ml d'eau distillée toluènée. On procède ensuite à l'extraction et à la mesure de l'activité phytasique ainsi qu'il a déjà été indiqué au chapitre précédent.

Résultats et Discussion

Dans le cas des graines de Sorgho Fela Blanc jaunâtre n°11, le taux d'hydrolyse de l'acide phytique dans les conditions opératoires précisées plus haut est de 4,1 p.cent

après deux jours de germination ; il passe à 11,4 p.cent après 4 jours de germination. Pour la variété Kongossan n°7, le taux d'hydrolyse après 4 jours est de 3,4 p.cent. Il est nettement plus faible pour l'échantillon Mboratel n°9 qui ne peut scinder que 1,4 p.cent du substrat. Dans les essais témoins réalisés en maintenant l'extrait aqueux de graines non germées à pH 5,2 pendant 4 jours la libération de phosphore minéral est insignifiante.

Au contraire dans les graines germées une fraction importante du phosphore organique de la graine se retrouve sous forme d'orthophosphates à la suite de la germination. Alors que normalement le phosphore minéral de nos échantillons ne représente qu'un faible pourcentage, après germination nous retrouvons sous forme de phosphore minéral 40 p.cent du phosphore organique dans le cas du Sorgho Fela blanc jaune, 39 p.cent pour la variété Mboratel et 66,5 pour le lot de Kongossan.

Ainsi les premières phases de la germination et de la croissance de la plantule se traduisent par une mobilisation brutale des composés organiques phosphorés au premier plan desquels se place l'acide phytique. Ces composés organiques engendrent rapidement des orthophosphates où des esters phosphoriques qui seront ensuite hydrolysés par les enzymes présents. La libération d'orthophosphates qui se produit dans nos expériences de germination est du même ordre de grandeur

que celle qui avait été observée par COLIN (28) au cours de la germination de la Lentille.

La germination de la graine de Sorgho s'accompagne donc de l'apparition de l'activité phytasique jusqu'alors inexistante ou dissimulée. L'activité glycérophosphatasique qui était déjà importante dans la graine en dormance subit aussi un accroissement puisque le taux d'hydrolyse du β-glycérophosphate ajouté est compris après 4 jours d'incubation entre 60 et 67 p.cent suivant les échantillons.

-:-

CHAPITRE III

-:-

DEMASQUAGE DE LA PHYTASE DU SORGHO ET DE DEUX AUTRES GRAMINEES A ACTIVITE MINIME

-:-

I) Essais de protéolyse limitée

L'absence d'activité phytasique dans les graines de Sorgho non germées soumises à notre expérimentation ainsi que la constatation par divers auteurs d'une activité pratiquement nulle des graines d'Avoine ou très faible des graines de Dactyle contrastent avec l'activité appréciable qui se manifeste dès les premiers stades de la germination de ces graines. Au cours du chapitre précédent nous avons indiqué quelles hypothèses avaient été proposées pour tenter d'expliquer l'apparition de l'activité phytasique quand cesse la dormance. La suggestion que la phytase préexisterait dans la graine mais serait inactive parce que combinée à une protéine inhibitrice est évidemment séduisante. L'enzymologie fournit de nombreux exemples de ce type: ainsi plusieurs protéases animales sont produites à l'état de zymogènes inactifs qu'une protéolyse limitée, catalysée par une trace de l'enzyme lui même ou d'une autre protéase, convertit en enzymes actifs.

L'activation du trypsinogène en trypsine par la trypsine ou l'entérokinase, celle du chymotrypsinogène ou de la procarboxypeptidase par la trypsine ont fait l'objet d'études approfondies. Nous avons effectué quelques tentatives à vrai dire peu poussées pour essayer de mettre en évidence une activité phytasique chez les graines de Sorgho non germées en présence ou après incubation de l'extrait enzymatique brut de graines avec une protéase. Notre choix s'est porté sur la papaïne parce qu'elle constitue la protéase végétale la mieux connue à l'heure actuelle. Après avoir vérifié que l'échantillon de papaïne commerciale dont nous disposions était doué d'une activité protéolytique suffisante : hydrolyse de 20 p.cent d'un substrat à la gélatine à pH 7 en 1 heure à 37°, nous nous sommes assurés qu'il était dépourvu d'activité phosphatasique et phytasique et pouvait ainsi convenir à l'essai que nous voulions entreprendre. Des extraits toluénés de graines de Sorgho ont été incubés avec une solution de papaïne à la concentration finale de 0,50 p.1000 pendant une durée de 1 à 3 jours à pH 6 à 37°, puis additionnés d'une solution de phytate de sodium tamponnée. D'autres essais ont été réalisés en ajoutant le phytate de sodium en même temps que la papaïne. Ces deux types d'expériences ont été faites avec et sans adjonction de cyanure de potassium, activateur classique de la papaïne. Bien que le pH de 6 choisi pour concilier celui de la phytase et celui de la papaïne ne représente pas

le pH optimum de cette protéase nous avons cependant opéré à cette valeur sachant que la chymopapaïne qui est toujours associée à la papaïne dans les préparations commerciales peut supporter une baisse de pH assez forte puisque son activité est encore très manifeste au voisinage de 2.

Ces quelques expériences se sont soldées par un échec complet. Aucune activité phytasique n'a pu être décelée dans ces essais de protéolyse partielle. Ceci ne prouve d'ailleurs pas l'inexistence d'une phytase bloquée par un inhibiteur protéique. La papaïne pourrait fort bien pousser trop loin l'action protéolytique ce qui aboutirait à la destruction de l'enzyme recherché. DEBRIS, COURTOIS et PETEK (53) dans leurs travaux sur la libération de l'α galactosidase rénale par digestion trypsique ont ainsi pu mettre en évidence qu'à une première phase dans laquelle l'α galactosidase est libérée et agit fortement sur le phényl α galactoside, succède une autre phase où l'on constate une diminution très nette de l'activité. Ces auteurs expliquent le phénomène en admettant que l'enzyme libéré subit peu à peu l'hydrolyse trypsique. L'épuisement de notre stock de graines ne nous a pas permis d'entreprendre des essais avec de la trypsine cristallisée en écourtant le temps de protéolyse. Il aurait peut être été également intéressant de rechercher s'il était possible de faire apparaître l'activité phytasique par incubation avec des protéases de graines. L'activité protéolytique du grain

de Blé normalement très faible s'accroît considérablement au moment de la germination MOUNFIELD (108). On pourrait suggérer que chez le Sorgho la germination fournirait la protéase activatrice de la phytase bloquée.

II) Démasquage des phytases de trois graines: Sorgho, Avoine, Dactyle, par emploi de faibles concentrations en substrat

Devant l'insuccès des tentatives de protéolyse destinées à mettre à jour une activité phytasique dans les graines du Sorgho, nous avons essayé d'aborder le problème du démasquage de la phytase sous un angle différent. L'idée directrice repose sur la propriété que possède l'acide phytique de s'unir aux protéines. Si la protéine est un enzyme, on peut concevoir que la combinaison qui s'établit inhibe le fonctionnement de ce dernier.

Développement des hypothèses de travail

Lorsque l'on réalise la précipitation fractionnée des macérations aqueuses de graines par des sels comme le sulfate d'ammonium ou des solvants organiques : alcool, acétone, méthylal, on constate que l'activité phosphomonoestérasique est présente dans une fraction qui précipite avant la fraction douée d'activité phytophosphatasique, FLEURY, COURTOIS et Collab. (15) (30) (31) (32) (34) (68).

La phytase paraît ainsi se comporter comme un enzyme dont la masse moléculaire est inférieure à celle de la phosphomonoestérase.

Ces faits paraissent liés aux recherches de BARRE (7), de BARRE et COURTOIS (10) relatifs aux combinaisons que peuvent contracter les esters phosphoriques avec les protéines. Travaillant avec divers esters phosphoriques : acide β-glycérophosphorique, acide tripolyphosphorique, acide tétramétaphosphorique, acide phytique, ces auteurs ont pu remarquer que c'était l'acide phytique qui fournissait avec les protéines les combinaisons les plus stables et les moins solubles. La combinaison qui s'établit entre la protéine et les esters orthophosphoriques appartient au type des liaisons salines. Elle s'effectue entre les groupements basiques libres des acides diaminés constitutifs de la protéine (lysine, arginine, histidine) et la fonction acide la plus forte (pK 1,84) de chacun des 6 restes orthophosphoriques fixés autour du noyau cyclohexanique du méso-inositol sous la forme chaise. En milieu acide, de pH compris entre 2 et 3, la combinaison acide phytique-protéine est insoluble ; elle est soluble au voisinage de la neutralité et au-dessus du point isoélectrique de la protéine. L'étude de la structure de l'acide phytique par BARRE, COURTOIS et WORMSER (13) a permis de formuler une hypothèse sur la nature de ces combinaisons. Selon ces auteurs, dans l'acide phytique sous la forme chaise, les

radicaux orthophosphoriques sont rapprochés les uns des autres. Ce rapprochement est tel qu'il est possible d'envisager l'existence de 4 liaisons hydrogène s'établissant entre les 4 fonctions acides très faibles (pK 9,2) de la molécule. La structure très ramassée de la molécule d'acide phytique (qui est par ailleurs l'ester le plus riche en acide orthophosphorique puisque le rapport C/P = 1), oblige la chaîne polypeptidique à se déformer pour que puisse se réaliser la salification entre les fonctions acides de l'ester et les groupes aminés libres des acides diaminés de la protéine. Ces déformations doivent s'effectuer de manière différente selon l'origine des groupes basiques qui sont impliqués. Ainsi on peut admettre qu'elles se font avec pliage et resserrement de l'hélice polypeptidique lorsque deux au moins des groupes basiques appartiennent à la même hélice ou chaîne polypeptidique. Il y aura écartement ou contraction lorsque la salification concerne des groupements basiques qui ne sont pas localisés sur la même chaîne polypeptidique. Les changements intervenus dans la conformation spatiale de la protéine, qui s'accompagnent d'une destruction des liaisons hydrogène et d'une modification dans la distribution des charges électriques consécutive à la salification, aboutissent à une insolubilisation de la combinaison acide phytique-protéine. L'insolubilisation des protéines par salification de leurs groupes cationiques par l'acide phytique a par la suite permis

à BARRE, COURTOIS, DELRIEU et PERLES (11) (12) (14) de mettre au point une technique de détermination du nombre de groupes basiques des diverses protéines et en particulier des protéines sériques normales et pathologiques. Ces recherches ont été étendues par DELRIEU (54) aux protéines urinaires. BARRE et LABAT (16) (17) ont utilisé l'acide phytique pour séparer les protéines des autres constituants des humeurs et pour séparer les β-lipoprotéines des α-lipoprotéines. COURTOIS, MALANGEAU et CHABRE (47) ont envisagé l'action de l'acide phytique sur les divers glycoprotéides. L'ensemble des recherches de l'école de COURTOIS sur les combinaisons des protéines avec l'acide phytique a conduit cet auteur à envisager la possibilité de combinaison entre l'acide phytique et les protéines enzymatiques (44) (45). Dans le cas d'une protéine enzymatique de masse moléculaire élevée, la combinaison contractée avec le glycérophosphate ne s'opposerait pas à la mise en contact du centre actif de l'enzyme avec le substrat. Au contraire dans le cas de l'acide phytique la déformation subie par l'édifice protéique de l'enzyme s'opposerait au contact entre le centre actif de ce dernier et le substrat ; de ce fait l'hydrolyse ne pourrait plus s'effectuer.

Il deviendrait alors possible d'imaginer que la phosphomonoestérase banale et la phytophosphatase possèderaient les mêmes centres actifs ou le même centre actif, la différence entre les deux enzymes résidant dans la structure de l'apo-enzyme. L'apo-enzyme de la phytophosphatase aurait une

masse moléculaire plus faible que celle de la phosphatase banale et l'agrégation moins marquée rendrait possible la mise en contact des centres actifs avec les liaisons orthophosphoriques à scinder de l'acide phytique. On pouvait de la sorte se demander si avec de très faibles doses d'acide phytique qui rendraient difficile ou imparfaite la combinaison acide phytique-protéine enzymatique, il deviendrait possible de déceler une activité phytasique chez les graines réputées inactives ou d'augmenter cette activité chez les graines dont l'activité phytasique est habituellement considérée comme particulièrement faible.

Pour essayer de répondre à cette question nous avons été amenés à utiliser des préparations enzymatiques purifiées. Cette purification apparaît assurément nécessaire. En effet, les préparations enzymatiques de graines obtenues par précipitation acétonique des macérations aqueuses renferment de l'acide phytique combiné aux protéines, ce qui entraîne une diminution ou même une suppression de l'activité phytasique. Nous avons pu observer, ainsi qu'il sera dit plus loin, que l'acide phytique apporté par les préparations enzymatiques brutes peut parfois représenter des taux supérieurs à ceux utilisés comme substrat dans certaines de nos expériences.

L'action inhibitrice de l'acide phytique vis-à-vis de l'hydrolyse du β-glycérophosphate par les phosphomonoestérases acides végétales déjà observée dans le laboratoire

de COURTOIS a été précisée par RICAUD-MANOUVRIER (125).

Cette inhibition peut résulter :

I°- d'une fixation de l'acide phytique sur l'enzyme, aboutissant à une combinaison relativement stable qui empêche le β-glycérophosphate de former la combinaison enzyme-substrat (inhibition concurrente).

2°- outre la combinaison acide phytique-phosphatase, l'acide phytique est susceptible de bloquer des cations nécessaires à l'activation de l'enzyme.

Ainsi l'acide phytique des graines se comporterait comme un inhibiteur naturel accompagnant l'enzyme dans les préparations enzymatiques incomplètement purifiées. Comme il a été montré par BARRE (7), l'acide phytique uni aux protéines peut être dissocié de ces combinaisons par relargage au moyen des sels neutres et du sulfate d'ammonium en particulier, vers O° puis dialyse. Ce procédé qui précipite les protéines, laisse en solution l'acide phytique. Dans les pages qui vont suivre nous décrirons des expériences effectuées avec des enzymes purifiés. Sous le terme d'enzyme purifié nous désignons une préparation protéique obtenue par fractionnement au moyen du sulfate d'ammonium ou de l'acétone, elle se caractérise par l'absence d'acide phosphorique minéral ou estérifié.

Obtention des préparations enzymatiques purifiées

Parmi les espèces végétales dont l'activité phytasique est insignifiante notre choix s'est porté sur les graines de trois Graminées : le Sorgho Fela blanc (Sorghum cernuum, Host), l'Avoine blanche (Avena Sativa.L) variété Bersée et le Dactyle peletonné (Dactylis glomerata L). L'obtention des préparations enzymatiques purifiées à partir des graines a été conduite en suivant les protocoles opératoires ci-dessous.

a)- Préparations enzymatiques purifiées d'Avoine et de Dactyle

Deux cents grammes de graines pulvérisées le plus finement possible sont épuisées par deux litres de solution aqueuse de chlorure de sodium à 9 g p.1000 additionnée de quelques gouttes de toluène. L'opération est menée par agitation mécanique durant deux heures. Le récipient bouché est ensuite abandonné 24 heures au réfrigérateur à +4°. puis agité de nouveau mécaniquement durant deux heures. On laisse ensuite reposer le mélange pendant une heure à la glacière. On décante afin de récupérer la phase liquide que l'on filtre sur papier. Cette manipulation étant relativement longue en raison de la teneur élevée des graines en matières amylacées, nous la réalisons à l'intérieur du réfrigérateur afin de diminuer les risques de dénaturation des protéines. Le filtrat est fractionné à +4°, BARRE (7), WORMSER (137) par addition de sulfate d'ammonium neutralisé à saturation (à la

température de +4°), de façon à obtenir une concentration finale en sulfate d'ammonium de 33 p.cent. On abandonne le mélange pendant 24 heures au réfrigérateur. Le précipité de protéines banales est ensuite éliminé par filtration. Le filtrat est porté à 80 p.cent de saturation en sulfate d'ammonium et à nouveau laissé 24 heures à la glacière. Le précipité recueilli par filtration est remis en solution dans 150 ml d'eau distillée et la solution dialysée contre de l'eau distillée pendant trois jours au réfrigérateur. Les protéines dénaturées sont alors éliminées par filtration. Le filtrat refroidi est additionné de 3 volumes d'acétone pure conservée à la température de -20°. On laisse précipiter à cette température après avoir ajouté quelques centigrammes de chlorure de sodium. Après 24 heures le faible précipité obtenu est rassemblé par centrifugation dans du matériel refroidi. On le dessèche dans le vide en présence d'Actigel. Le résidu grisâtre qui résulte de cette opération est pulvérisé au mortier. 100 g de graines d'Avoine fournissent environ 170 mg de précipité protéique et 100 g de graines de Dactyle donnent 200 mg.

b) - Préparation enzymatique purifiée de Sorgho

Avec le Sorgho qui est très pauvre en protéines extractibles à l'eau (22) mais qui par contre contient une importante proportion de prolamines en particulier de la Kafi-

rine assez voisine de la zéine (+) JOHNS et BREWSTER (91) nous avons du, après plusieurs échecs, modifier le procédé d'extraction adopté pour les graines d'Avoine et de Dactyle, les rendements en protéines finales étant extrêmement faibles. Le liquide d'extraction aqueuse des graines pulvérisées de Sorgho est précipité par 3 volumes d'acétone à -20°. Le précipité très riche en dérivés orthophosphoriques est solubilisé dans l'eau distillée à +1° et précipité par le sulfate d'ammonium à 80 p.cent de saturation. Le précipité recueilli est dialysé et à nouveau précipité par l'acétone à -20°. On dessèche dans le vide. 100 g de graines donnent environ 60 mg de précipité protéique renfermant au voisinage de 9,5 à 10,5 p.cent d'azote suivant les préparations.

Méthodes d'étude de l'activité phytasique des graines peu actives

Nous avons eu recours à deux méthodes différentes pour tenter de mettre en évidence l'activité des graines pratiquement dépourvues de phytase.

A) La première consiste à mettre en présence de quantités fixes d'enzymes de très faibles concentrations initiales de substrat que l'on augmente ensuite progressivement avec

---

(+) La différence la plus notable entre la Kafirine et la zéine est la coagulabilité à chaud de la prolamine du Sorgho.

le temps. La durée des expériences a été, suivant les cas, comprise entre 1 et 5 jours.

B) Dans la deuxième méthode, nous avons opposé à des concentrations constantes d'enzyme des concentrations initiales variables en substrat. Ces concentrations très faibles s'étageaient entre M/5000 et M/100 exprimées en acide orthophosphorique estérifié dans le milieu réactionnel, valeurs qui correspondaient à des concentrations en acide phytique comprises entre M/30.000 et M/600. Dans tous ces essais, après des durées d'incubation calculées, l'action enzymatique est arrêtée selon le protocole opératoire de COURTOIS et PEREZ déjà utilisé précédemment : addition d'un mélange d'acide acétique et d'acétate d'ammonium et de mixture magnésienne. Après insolubilisation de l'acide orthophosphorique à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien nous avons dosé l'acide orthophosphorique en suivant la méthode de Misson (technique de Fleury et Leclerc).

A) Hydrolyses comparées du phytate et du glycérophosphate de sodium étudiées par addition progressive de faibles quantités de substrat à des concentrations constantes d'enzyme.

I°- Le substrat est constitué par des solutions de phytate et de glycérophosphate de sodium M/100 en acide orthophosphorique estérifié. A la solution d'enzyme additionnée

de tampon acide acétique-soude de pH 5,15, nous opposons 1 ml de substrat, puis après une durée d'incubation déterminée à 37°, nous ajoutons à nouveau 1 ml de substrat et ainsi de suite jusqu'à atteindre la quantité finale de 5 ml après 1, 2 ou 5 jours suivant les cas. Les concentrations en substrats passent progressivement pour les 50 ml de mélange final enzyme-substrat de M/5000, M/2500, M/1665, M/1250 à M/1000. Les résultats de ces expériences sont consignés dans le tableau VI. L'examen de ce tableau permet de formuler les observations suivantes :

L'activité phosphatasique se manifeste dès le premier jour et cette activité n'augmente que modérément par la suite. Dans le cas de l'enzyme d'Avoine, il n'apparaît aucune activité phytasique. Pour l'enzyme de Sorgho l'activité phytasique ne devient décelable qu'après 48 heures d'incubation. Les essais parallèles effectués avec la poudre de graines de Sorgho utilisée comme source d'enzyme fournissent des résultats qui au premier abord peuvent sembler curieux. En effet, on peut remarquer que la poudre de Sorgho seule en milieu tamponné libère de l'acide orthophosphorique et que ces quantités pour les deux premiers jours se montrent supérieures aux quantités d'acide orthophosphorique trouvées dans les essais effectués avec la poudre de Sorgho additionnée de phytate comme substrat.

(+) Dans tous les tableaux I.H.P. désigne l'acide phytique et G P l'acide glycérophosphorique.

(1) A la concentration finale M/1000 l'hydrolyse totale du substrat libère sous forme d'acide orthophosphorique 1.560 µg de phosphore.

(2) Un témoin constitué par 0,50 g de poudre de graines de Sorgho sans addition de substrat libère après un jour 810 µg, après 2 jours 975 µg et après 5 jours 1700 µg de phosphore.
Les valeurs données dans cette colonne sont obtenues après soustraction du phosphore libéré par la poudre de Sorgho témoin.

(3) Le substrat est ajouté par fraction de 1 ml M/100 d'heure en heure du temps 0 à la 4e heure ; le phosphore libéré est dosé 24 h après la dernière addition de substrat.

(4) Les 5 ml de substrat sont ajoutés par fractions de 1 ml réparties sur les 24 premières heures. Le dosage du phosphore libéré est effectué 24 h après la dernière addition de substrat.

(5) Le substrat est ajouté à raison de 1 ml par jour du temps 0 au 5e jour. Le dosage du phosphore libéré est effectué 24 h après la dernière addition de substrat.

Tableau VI

Activité phytasique et glycérophosphatasique de l'Avoine et du Sorgho

Température 37° - pH 5,15 - Volume réactionnel total 50 ml. Enzymes purifiés : 1 ml de solution à 1 p.1000 ou poudre de graines de Sorgho 0,50 g - Substrat ajouté progressivement au cours de la durée d'incubation - Concentration initiale M/5000, concentration finale M/1000 (1)

	Substrat	I H P (+)			G P		
ée u- ion n rs	Origine de l'enzyme	Enzyme purifié Avoine	Enzyme purifié Sorgho	Poudre de Sorgho (1)	Enzyme purifié Avoine	Enzyme purifié Sorgho	Poudre de Sorgho (2)
3)	P libéré en µ g...	0	0	0	126	362	1330
	Pourcentage d'hydrolyse du substrat ajouté				8,2	23,4	86
4)	P libéré en µ g...	0	0	0	196	395	1550
	Pourcentage d'hydrolyse du substrat ajouté				12,7	25,5	100
5)	P libéré en µ g...	0	780	947	305	399	1395
	Pourcentage d'hydrolyse du substrat ajouté		50,5	60,5	19,6	25,6	90

Ainsi, au premier jour, le mélange : poudre de Sorgho + substrat a libéré 87 µg de phosphore et 875 µg au deuxième jour, alors que les témoins à la poudre de Sorgho non additionnée de substrat libèrent respectivement 810 µg et 975 µg.

Ces valeurs "négatives" 87 et 875 ne figurent pas dans le tableau VI.

La libération du phosphore phytique du substrat ne débute dans les essais conduits avec la poudre de graines de Sorgho que lorsque tout le phosphore phytique présent dans la graine a été hydrolysé.

Nous tenterons d'expliquer ce phénomène plus loin.

2°- Dans une deuxième série d'essais la concentration en enzyme a été doublée et l'on a établi la comparaison entre la libération de l'acide orthophosphorique de l'acide phytique sous l'action de la préparation d'enzyme purifié de Sorgho d'une part et sous l'action de la poudre de graine de Sorgho d'autre part.

Le tableau VII résume les résultats obtenus dans ces expériences. On peut constater que l'acide glycérophosphorique subit une hydrolyse pratiquement totale. Dans le cas de l'acide phytique, l'enzyme purifié peut libérer 67,5 p.cent de l'acide orthophosphorique du substrat, tandis que la poudre de graines ne provoquera qu'une hydrolyse plus faible, atteignant 38,7 p.cent. Ce retard correspond au fait que l'acide phytique présent dans la poudre de graine subit une

hydrolyse préférentielle qui précède celle de l'acide phytique ajouté comme substrat.

Tableau VII

Activités phytasique et glycérophosphatasique de l'enzyme purifié et de la poudre de Sorgho.

Température 37° - pH 5,15 - Volume réactionnel total 50 ml. Enzyme purifié de Sorgho 1 ml de solution à 2 p.1000 ou poudre de graines de Sorgho 0,50 g - Substrat ajouté par fractions de 1/5 en 5 jours - Concentration initiale M/5000, concentration finale M/1000.

Substrat	I. H. P.		G P	
Origine de l'enzyme	Enzyme de Sorgho	Poudre de Sorgho (+)	Enzyme de Sorgho	Poudre de Sorgho (+)
Phosphore libéré en µg après 5 jours	1050	600	1530	1530
Pourcentage d'hydrolyse du substrat ajouté	67,5	38,7	98,5	98,5

(+) La poudre de Sorgho témoin, sans addition de substrat libère après 5 jours 1635 µ g de phosphore. Les résultats de cette colonne sont obtenus après soustraction du phosphore libéré par le témoin.

3°- Dans la série d'expériences dont les résultats sont rassemblés dans le tableau VIII, nous avons utilisé une solution à 5 p.1000 dans l'eau distillée d'enzyme purifié de Sorgho. La quantité de substrat que l'on a ajoutée est ré-

duite à un maximum de 2 ml de solution M/100 au lieu de 5 ml qui étaient employés dans les essais précédents. Dans une première série de fioles, nous introduisons au départ 1 ml de substrat M/100. L'acide phosphorique libéré est déterminé après un jour et trois jours de contact. Dans une seconde série de fioles la concentration en substrat égale à la précédente au début est doublée au troisième jour et l'acide phosphorique résultant de l'hydrolyse enzymatique est apprécié après 5 jours.

Dans ces conditions opératoires, on observe qu'avec une concentration en enzyme de 5 p.1000, le taux d'hydrolyse des acides glycérophosphorique et phytique atteint presque 90 p.100 dès le premier jour et qu'il ne s'élève pas au troisième jour. Lorsque la quantité de substrat a été doublée au troisième jour, une nouvelle quantité de phosphore est apparue, mais celle-ci est nettement plus faible de sorte que le taux final de l'hydrolyse subit un abaissement d'environ un tiers bien que la quantité de substrat dans la seconde partie de l'expérience ait été choisie peu élevée puisqu'égale à M/2500 dans le volume réactionnel.

Tableau VIII

Hydrolyse phytasique et glycérophosphatasique par l'enzyme purifié de Sorgho.

Température 37° - pH 5,15 - Volume réactionnel 50 ml.
Enzyme purifié de Sorgho 1 ml de solution à 5 p.1000

Durée d'incubation	1 jour	3 jours	5 jours
Concentration en substrat au moment du dosage	$\frac{M}{5.000}$	$\frac{M}{5.000}$	$\frac{M}{2.500}$
Pourcentage d'hydrolyse de l'acide glycérophosphorique	89	89	60
Pourcentage d'hydrolyse de l'acide phytique	89	89	66

4°- Des essais analogues ont été réalisés en utilisant des préparations enzymatiques assez grossièrement purifiées. Celles-ci renfermaient encore du phosphore phytique et ce dernier est libéré par l'enzyme qui lui est associé diminuant ainsi de façon notable la libération du phosphore du substrat ajouté.

Ces enzymes impurs sont aisément obtenus en précipitant par l'acétone refroidie à -20° des macérations aqueuses refroidies de graines de Sorgho et de Dactyle. Le précipité obtenu après séjour à la glacière à -20° est récupéré par centrifugation, et séché dans le vide. Les produits de cou-

leur chamois que l'on obtient sont utilisés sous forme de solution aqueuse à 5 p.1000. A 1 ml de solution d'enzyme, on oppose 1 ml de substrat M/100. Après 24 h d'incubation à 37°, on ajoute à nouveau 1 ml de substrat M/100. L'acide orthophosphorique libéré est déterminé après 48 h de contact. Les résultats de ces expériences sont groupés dans le tableau IX. On peut facilement remarquer que les témoins ne renfermant pas de substrat libèrent des quantités d'acide orthophosphorique qui peuvent presqu'égaler les quantités ajoutées sous forme combinée lors de la première addition de substrat. En effet, les prises d'essais d'enzyme de Sorgho et de Dactyle libèrent respectivement 262 μ g et 218 μ g en 24 heures et ces valeurs atteignent 597 et 467 μ g en 48 heures.

Ces quantités ont été déduites de la quantité totale d'acide orthophosphorique libérée après incubation avec le substrat et les valeurs qui figurent dans le tableau IX correspondent à l'acide phosphorique résultant de l'hydrolyse enzymatique des substrats.

Tableau IX

Activités phytasique et glycérophosphatasique des enzymes bruts de Sorgho et de Dactyle

Température 37° - pH 5,15 - Volume réactionnel 50 ml. Concentration en enzyme 1 ml de solution à 5 p.1000 - Substrat ajouté en 2 fois, au début et au deuxième jour.

strat	I H P				G P			
ne enzyme	Sorgho		Dactyle		Sorgho		Dactyle	
ubation	1 jour	2 j.	1 jour	2 j.	1 jour	2 j.	1 jour	2 j.
ntration bstrat ..	M/5000	M/2500	M/5000	M/2500	M/5000	M/2500	M/5000	M/2500
hore li- en µg ..	174	240	78,5	250	218	242	262	340
entage lrolyse ubstrat é	56	38,5	25,5	17,5	70	39	84,5	55
hore li- par l'en- sans ad- n de sub- en µg..	262	597	218	457				

B) Influence de la concentration initiale du substrat

Dans les expériences décrites dans ce paragraphe, on a opposé à une quantité constante d'enzyme des concentrations en substrat variables et de molarités comprises entre M/100 et M/5000. La durée de l'hydrolyse n'a pas été poussée au-

delà de 24 heures. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau X. On peut observer que l'acide glycérophosphorique est hydrolysé d'une façon notable pour des concentrations en substrat extrêmement larges comprises entre M/5000 et M/100. A la concentration M/1000 le taux d'hydrolyse atteint sa valeur la plus élevée, l'hydrolyse étant presque totale. A la concentration M/100, le cinquième environ du substrat glycérophosphorique est décomposé. L'activité phytasique est nettement mise en évidence pour le Sorgho et le Dactyle qui scindent l'acide phytique pour des concentrations en substrat comprises entre M/5000 et M/1000, les pourcentages d'hydrolyse obtenus avec les deux enzymes étant du même ordre de grandeur. Dans le cas de l'enzyme d'Avoine, l'hydrolyse phytasique ne se manifeste qu'à de plus faibles concentrations en substrat ; elle n'a pu être décelée que pour une concentration en acide phytique de M/5000 mais le taux d'hydrolyse est alors le même que pour les deux autres enzymes avec la même concentration en substrat. Pour une concentration en acide phytique supérieure à M/5000 il n'a pas été possible de déceler la moindre hydrolyse du substrat.

Tableau X

Hydrolyse phytasique et glycérophosphatasique en fonction de la concentration initiale en substrat

Durée de l'hydrolyse 24 h, à 37°, et pH 5,15 - Volume réactionnel 50 ml.
Enzymes : 1 ml de solution d'enzyme purifié à 5 p.1000

rat	IHP	GP	IHP	GP	IHP	GP	IHP	GP	IHP	GP	IHP	GP
ration trat milieu	M/5000		M/2500		M/1000		M/500		M/250		M/100	
orgho	77,5	77,5	79,7	79	39,6	70,5	0	50,7	0	25,4	0	11,2
voine	77,5	67,6	0	75,2	0	75,5	0	55	0	25,2	0	8,2
actyle	77,5	77,5 (+)	70,5	86	31,6	94,2	0	86	0	55,5	0	19

(+) Les chiffres du tableau représentent les pourcentages d'hydrolyse du substrat.

Discussion

L'ensemble des résultats des expériences exposées au cours de ce chapitre montre qu'en utilisant des doses très faibles d'acide phytique comme substrat, il devient possible de démasquer une activité phytasique notable dans les préparations enzymatiques purifiées de trois graines qui, pour deux d'entre elles, étaient jusqu'alors considérées comme à

peu près inactives ou même complètement inactives. Le cas du Sorgho ne semble pas avoir été envisagé avant nos recherches. Lorsque l'on augmente la concentration en substrat, on provoque rapidement une diminution ou même un arrêt de l'hydrolyse enzymatique. L'acide phytique se comporte ainsi comme son propre inhibiteur.

Quelles explications peut-on tenter de donner de ce phénomène ? Les expériences de BARRE et COURTOIS (6) (9) (10) relatives aux combinaisons s'établissant entre les esters phosphoriques et les protéines nous ont appris qu'en milieu acide la courbe de solubilité des protéines diminue et que parmi les esters phosphoriques envisagés par ces auteurs c'était l'acide phytique qui fournissait les précipités de combinaison acide phytique-protéine les moins solubles. La notion de combinaison ester phosphorique-protéine peut raisonnablement être étendue au cas particulier de protéines que représentent les enzymes. Les phosphomonoestérases qui se révèlent incapables de provoquer la scission hydrolytique de l'acide phytique peuvent néanmoins s'unir à cette substance. Nous avons déjà fait observer que d'après RICAUD-MANOUVRIER (125), l'hydrolyse du β glycérophosphate par la phosphatase d'Amande est inhibée par l'acide phytique ajouté au milieu à la concentration M/100. Cette inhibition se produit au-dessous de pH 6 qui est justement la zone pour laquelle les combinaisons entre l'acide phytique et la protéine sont les

plus stables. Il a également été signalé par cet auteur que l'inhibition augmente lorsque la concentration en acide phytique croît (cas de la phosphatase de la hampe florale d'Hellébore).

Nous avons déjà aussi attiré l'attention sur le fait que la précipitation fractionnée indique que les phosphomonestérases qui précipitent avant les fractions à activité phytasique doivent présenter une masse moléculaire plus élevée ou une structure plus condensée que les phytases.

COURTOIS et LINO (48) supposent que les phosphomonoestérases auraient des groupes actifs qui pourraient hydrolyser les liaisons ester de l'acide phytique mais si cette hydrolyse ne se produit pas c'est vraisemblablement parce que l'acide phytique en s'unissant à l'enzyme provoque une déformation de l'architecture de l'édifice protéique se traduisant par une impossibilité de fonctionnement du groupe actif.

Dans le cas des phytases dont la molécule serait moins condensée ou dont la masse moléculaire serait plus faible, l'acide phytique en s'unissant à la protéine n'apporterait que des modifications moins marquées dans la structure de la protéine enzymatique. Dans ces conditions, le centre actif de cette dernière pourrait remplir le rôle qui lui revient. Ainsi les phytases ne se distingueraient des phosphatases que par une moindre sensibilité aux modifications de structure que peut provoquer l'acide phytique, tout au moins lorsque

cet acide ne se comporte pas comme un inhibiteur de sa propre hydrolyse, en déformant fortement l'arrangement de l'architecture protéique par salification des groupes basiques de la protéine. L'activité phytasique serait le privilège de phosphatases possédant non pas un centre actif particulier mais une structure moléculaire qui permettrait à l'acide phytique de s'unir à l'enzyme sans que la protéine subisse de profondes altérations dont la conséquence directe est l'inactivation.

La diminution du pourcentage d'hydrolyse et l'inhibition qui se manifestent rapidement lorsque l'on vient à augmenter les quantités de substrats offertes pourraient s'expliquer en admettant que par action de masse l'acide phytique réalise un blocage plus accentué des groupes basiques de la protéine enzymatique qui en se ramassant sur elle-même ou en précipitant perd son activité. Nous avons pu montrer que dans les préparations enzymatiques impures, renfermant toujours une proportion notable d'acide phytique, l'inhibition est particulièrement nette. Les expériences permettent de constater que la libération du phosphore phytique est supérieure dans les solutions témoins, contenant seulement l'acide phytique naturel accompagnant l'enzyme (poudre de farine de Sorgho), par rapport aux essais effectués au moyen de poudre de graines de Sorgho additionnée de solutions de phytate, même à des concentrations relativement peu élevées. Ces résultats,

a priori assez paradoxaux, d'hydrolyse enzymatique nettement plus marquée en l'absence de substrat ajouté doivent être examinées à la lumière des travaux de COURTOIS, DESJOBERT et FLEURENT (43) relatifs à l'hydrolyse de divers inosito - hexaphosphates métalliques peu solubles (calcium, magnésium, fer, aluminium) par la phytase purifiée de son de Blé privée de phosphore organique.

L'hydrolyse de ces divers phytates par cet enzyme, cependant très actif, est en relation avec la solubilité et l'ionisation du sel. Les phytates de fer et d'aluminium, qui représentent d'ailleurs les formes principales sous lesquelles se rencontre l'acide phytique dans le sol, sont au nombre des phytates se distinguant par leur quasi insolubilité en milieu d'acidité moyenne. L'ionisation est également extrêmement réduite au point que le thiocyanate de potassium ne peut permettre de déceler l'ion Fe^{+++} au sein de la suspension de phytate ferrique. Les phytates de fer et d'aluminium ne sont pratiquement pas hydrolysés par la phytase, même en prenant soin de multiplier les contacts par agitation continue ou en prolongeant la durée incubation au-delà des temps habituellement employés.

Le cas des graines est sensiblement différent de celui des phytates du sol. Dans ces dernières, l'acide phytique est essentiellement présent sous forme de sel mixte de calcium et de magnésium relativement plus soluble dans les milieux faiblement acides. A la faveur de l'acidité des milieux

d'incubation située autour de pH 5,15 à 5,5, zone où se situent les optimums d'activité des diverses phytases végétales, le phytate de la graine se solubiliserait lentement ce qui ne réaliserait qu'une faible concentration en substrat dans le milieu. Dans ces conditions, la phytase de la graine pourrait hydrolyser progressivement l'acide phytique au fur et à mesure que celui-ci passe à l'état de solution.

Ces arguments sont également appuyés par les observations de WORMSER (137). Cet auteur a pu constater que l'activité phytasique de la fraction I du son de Blé ne se manifeste qu'à partir de pH 4,8 en présence d'ion calcium. Ceci s'explique du fait qu'à partir de pH 5 le phytate de calcium commence à précipiter ce qui aboutit à une diminution de la concentration en phytate soluble dans le milieu.

Dans nos expériences, lorsqu'à la poudre de Sorgho capable d'hydrolyser de manière appréciable son propre phytate, on vient à ajouter du phytate de sodium, même à des concentrations relativement faibles, on note que l'hydrolyse s'abaisse considérablement et peut même ne plus se produire au point que l'acide phytique préexistant n'est pas toujours attaqué.

En définitive, tout se passe comme si dans la graine l'enzyme et le substrat se trouvaient dans des proportions convenables pour que puisse se réaliser l'hydrolyse enzymatique. Un apport extérieur de substrat, même en proportion limitée, venant s'ajouter aux petites quantités disponibles de la

graine, tend à s'opposer aux conditions favorables de concentration en acide phytique qu'exige le fonctionnement de ces phytases peu actives.

-:-

CHAPITRE IV

-:-

ETUDE SOMMAIRE DE DEUX AUTRES ACTIVITES ENZYMATIQUES DES GRAINES DE MILS ET DE SORGHOS : L'ACTIVITE AMYLASIQUE ET L'ACTIVITE β-GLUCOSIDASIQUE

-:-

Dans le dernier chapitre de cette Deuxième Partie, nous donnerons un bref aperçu de quelques expériences consacrées à deux autres manifestations de l'activité hydrolasique des graines de Mil et de Sorgho. Nous avons examiné les propriétés amylasique et β-glucosidasique de ces graines car au cours de la germination, l'exaltation ou l'apparition de ces deux activités glucosidasiques est intéressante à considérer sous l'angle de l'hygiène alimentaire.

Comme chez la plupart des graines amylacées, la germination entraîne une augmentation considérable de l'activité amylasique qui doit permettre à la plantule d'utiliser l'amidon mis en réserve dans l'albumen. Cette hydrolyse fournit des substances glucidiques aisément fermentescibles par les levures, phénomène exploité pour la préparation de boissons alcooliques. Par ailleurs la β-glucosidase de la graine réalise l'hydrolyse d'un hétéroside cyanogénétique qui se forme dans les parties vertes. La libération d'acide cyanhydrique

est susceptible de provoquer parfois des intoxications plus ou moins graves.

I) La Bière de Sorgho (I) (117)

Le Sorgho est utilisé dans tous les pays producteurs pour préparer une boisson fermentée comparable à la bière et qui est consommée sur place. Elle titre environ 6° alcooliques, renferme un peu de maltose et fournit un résidu riche en amidon. Sa fabrication comporte un maltage préalable comme dans l'obtention de la bière d'orge. Il n'est pas possible de donner une description précise concernant la préparation de cette boisson dont la fabrication locale est sujette à un certain nombre de variations inhérentes aux coutumes des différents villages. Cette bière est désignée sous divers noms ; en Afrique occidentale c'est le Dolo, le Sam, le Chapalo, en Afrique équatoriale c'est le Pombé ou le Pipi. En Ethiopie on la connaît sous le nom de Talla tandis qu'en Afrique du Sud c'est le Kafir-beer (bière des Cafres). En Afrique, on réalise d'abord une germination de 48 heures des grains mouillés. Cette opération a pour but de faire apparaître une activité amylasique qui doit donner naissance à du maltose et du glucose fermentescibles. On sèche ensuite au soleil et broie entre deux pierres. On mélange cette farine avec deux tiers de son poids de graines non germées. On ajoute de l'eau puis fait bouillir une ou deux fois. Après refroidissement le li-

quide est abandonné dans de larges vases ouverts à l'air libre. Quelques heures après, la fermentation débute à la faveur de nombreux insectes qui viennent souiller le liquide. Ces derniers apportent la levure responsable de la conversion des sucres en alcool. L'agent de la fermentation est le Schizosaccharomyces pombe qui peut travailler jusqu'à + 35°.

Il est ensuite possible de distiller cette bière pour obtenir un alcool de Sorgho ou Argui titrant jusqu'à 40°. Les deux constituants de l'acide phytique du grain de Sorgho interviennent au cours de la fabrication de cette bière. L'acide orthophosphorique, libéré de l'acide phytique au cours de la germination fournit le phosphore nécessaire aux diverses réactions de la phase anaérobie de la fermentation alcoolique qui se réalise, on le sait, par l'intermédiaire d'une série d'esters phosphoriques. Le méso-inositol joue également un rôle important. En effet il est considéré par certains auteurs comme faisant partie du coenzyme des α-amylases. Cette propriété parfois contestée a été récemment défendue par RAMACHANDRAN (122). Par ailleurs le méso-inositol est un facteur de croissance indispensable à de nombreuses levures et Schizosaccharomyces pombe figure au nombre de celles-ci. Cette levure dont le développement est proportionnel à la teneur en méso-inositol du milieu qui lui est offert est l'un des micro-organismes les plus utilisés pour la détermination quantitative du méso-inositol dans les préparations biologiques les plus diverses (26).

Détermination de l'activité amylasique des graines de Sorghos et Mils germés

Nous avons voulu apprécier l'importance de l'activité amylasique de quelques échantillons de nos graines après germination. Bien que les Sorghos paraissent seuls être employés pour la fabrication de la bière, nous avons également effectué des essais sur les graines de Mil. A cet effet, cinq grammes de graines désinfectées ont été mises à germer pendant 48 heures, en observant les précautions décrites antérieurement. En deux jours la tigelle atteint 4 à 6 cm. La récolte est triturée au mortier avec 50 ml d'eau distillée. La suspension obtenue est versée dans un flacon renfermant une goutte de toluène et l'on abandonne à la glacière à + 4° pendant 2 heures. On soumet ensuite à une agitation mécanique d'une heure puis procède à la centrifugation pour récupérer le surnageant.

On prépare par ailleurs le substrat en milieu tamponné de la manière suivante : dans une fiole jaugée on introduit :

Amidon soluble	4 g
Phosphate mono-potassique	4,5 g
Phosphate disodique crist.	6,0 g
Eau distillée q.s.p.	100 ml

Le mélange est transvasé dans une fiole d'Erlenmeyer puis porté à l'ébullition et filtré. La solution limpide obtenue a un pH voisin de 6,8.

La mesure de l'activité enzymatique est réalisée comme suit :

Dans une série de fioles on introduit successivement :

Liquide de centrifugation des graines germées ..... 5 ml

Substrat à pH 6,8 ..... 10 ml

Eau distillée q.s.p. ..... 50 ml

On prépare parallèlement des solutions témoins renfermant 5 ml de liquide de centrifugation de graines germées amenées à un volume de 50 ml avec de l'eau distillée et par ailleurs une solution de 50 ml renfermant 10 ml de solution de substrat. L'ensemble des flacons bouchés est porté à l'étuve à 37° durant 18 heures. Ce délai écoulé, la réaction enzymatique est arrêtée en ajoutant dans chaque fiole 2 ml de lessive de soude. On procède ensuite à l'évaluation du pouvoir réducteur vis-à-vis de la liqueur de Fehling par titrage direct. Au préalable ce réactif cupro-alcalin aura été étalonné par rapport à une solution de maltose à 1 p.cent.

Il est en effet beaucoup plus logique d'exprimer les résultats en maltose libéré plutôt qu'en glucose car l'amylase donne naissance à du maltose à partir de l'amylose et de l'amylopectine. Le glucose qui prend naissance au cours de l'hydrolyse provient surtout de l'action d'une α glucosidase associée.

Résultats et Discussion

Les valeurs obtenues après soustraction des valeurs fournies par les essais témoins montrent qu'il y a apparition de quantités importantes de maltose. A partir de ces quantités, il est aisé de calculer le pourcentage d'amidon hydrolysé dans les conditions opératoires indiquées. Les résultats figurent dans le tableau XI.

Tableau XI

Pourcentage d'amidon soluble hydrolysé en 18 h à 37° et pH 6,8 par les extraits aqueux de graines germées de Mils et Sorghos

Origine de l'enzyme	Pourcentage d'hydrolyse
Sanio n°1	82
Sanio n°2	84
Souna n°4	85,5
Sorgho Fela blanc n°10	88,0

On peut considérer que l'amidon opposé aux extraits enzymatiques de graines germées subit une hydrolyse pratiquement maximale. En effet l'activité amylasique résulte de l'action combinée de deux amylases. Dans le Sorgho non germé l'activité amylasique est négligeable contrairement à ce que l'on observe pour le Blé, l'Orge et le Seigle. Cette activité est rapportée à une β-amylase (exoamylase). Lors de la germi-

nation l'activité β-amylasique du Sorgho augmente légèrement tandis qu'apparaît une α-amylase (endoamylase) très active, KNEEN (93). On admet que les β-amylases peuvent convertir jusqu'à 85 p.cent de l'amidon en maltose, laissant subsister un noyau réfractaire à leur action et que l'on désigne classiquement sous le nom de dextrines limites. Les α-amylases dans les meilleures conditions fournissent 87 p.cent de maltose et 13 p.cent de glucose lorsque le substrat est l'amylose. Dans le cas de l'amylopectine, il apparaît du maltose, et un résidu de dextrines branchées dont la structure est encore imparfaitement élucidée (49).

Il y a peu de différences entre les taux d'hydrolyse obtenus avec les quatre préparations de graines étudiées. Le Sorgho vient cependant en tête, le rendement de l'amylolyse atteignant les valeurs théoriques fournies par les amylases les mieux connues. L'utilisation préférentielle du Sorgho par les indigènes pour fabriquer leur bière semble ainsi tout à fait justifiée.

II) L'acide cyanhydrique du Sorgho germé

Au cours de nos expériences sur les graines de Sorgho germées, notre attention ayant été attirée par l'odeur d'acide cyanhydrique qui se dégageait lors du broyage des graines, nous avons entrepris la recherche de cette substance sur tous les échantillons dont nous disposions.

Un hétéroside cyanogénétique a été extrait des plantules de Sorgho germé, il est connu sous les noms de dourine, durrhine ou mieux durrhoside (W. DUNSTAN et T.A. HENRY 1902). Ces noms dérivent de celui de doura qui est synonyme de Sorgho et celui de durrha désigne aussi une espèce de Sorgho (Sorghum durrha). Le durrhoside est hydrolysable par la β-glucosidase qui scinde l'hétéroside en glucose, acide cyanhydrique et p.hydroxybenzaldéhyde.

Nous avons recherché la présence d'acide cyanhydrique dans les broyats de graines de Mils et Sorghos non germées et germées.

Dans ce but 0,50 g de produit broyé sont introduits dans un tube à essai et humectés avec 1 ml d'eau distillée, on ajoute une goutte de toluène pour faciliter la plasmolyse.

Un papier imprégné de réactif de Guignard au picrate de sodium est disposé à la partie supérieure du tube où il est maintenu par le bouchon de liège servant à l'obturation. Les tubes fermés sont ensuite placés pendant 1 heure à l'étuve à 37°.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

I°- Les graines non germées de Pennisetum et Sorghum ne libèrent pas d'acide cyanhydrique. Il en est de même des graines de Pennisetum germées.

2°- Les broyats des sept échantillons de graines de Sorgho soumises à une germination de deux jours ont libéré de

l'acide cyanhydrique.

Cette libération d'acide cyanhydrique ne résulte pas de l'apparition d'une β-glucosidase susceptible de dédoubler l'hétéroside cyanogénétique préformé, car une β-glucosidase préexiste dans toutes les graines avant germination. En effet les graines de Pennisetum et Sorghum libèrent de l'acide cyanhydrique lorsqu'à leur broyat on ajoute un hétéroside cyanogénétique comme l'amygdaloside. Par ailleurs la substance cyanogénétique ne paraît pas exister dans le Sorgho non germé puisque l'addition de β-glucosidase très active d'émulsine d'Amande à la farine de Sorgho non germé ne se traduit pas par une libération d'acide cyanhydrique.

Il est possible que l'hétéroside cyanogénétique se forme au cours de la germination par transglucosidification à partir d'un oside donateur de glucose, sur un accepteur synthétisé au cours des réactions du métabolisme azoté de la plantule. Les parties vertes en voie de croissance que l'on peut aisément séparer de la graine germée se montrent beaucoup plus actives que la graine elle-même.

D'après certains auteurs, il existerait des espèces qui ne seraient pas cyanogénétiques. Ainsi selon MEADLY (105), le Sorghum sudanense exempt de tout hybride ne donnerait à aucun moment de sa croissance naissance à de l'acide cyanhydrique. Cette opinion est loin d'être partagée car plusieurs publications font état d'intoxication par S. sudanense (119).

Quelle que soit l'origine biochimique de l'hétéroside cyanogénétique du Sorgho, sa recherche systématique dans nos échantillons nous a semblé utile car les intoxications cyanhydriques par le Sorgho ou le Manioc (dont l'hétéroside est identique au linimaroside) ne sont pas exceptionnelles en Afrique noire. Il s'agit heureusement le plus souvent d'intoxications du bétail ayant consommé du Sorgho jeune, car le Sorgho mûr a perdu sa toxicité. Les pousses qui se développent très rapidement après les invasions de sauterelles sont particulièrement nocives et peuvent tuer le gros bétail en quelques minutes, ROSE (128).

On peut se demander si la préparation et la consommation de la bière de Sorgho risquent de provoquer des intoxications accidentelles dues à l'acide cyanhydrique. Celles-ci ne paraissent pas avoir été signalées et cela peut s'expliquer du fait que les graines germées mélangées aux graines non germées sont soumises à une ou plusieurs ébullitions avec de l'eau dans des récipients ouverts. Cette opération étant habituellement opérée à l'extérieur des locaux, le toxique diffuse dans l'atmosphère où sa dilution rapide le rend inoffensif. Cette coutume empirique ne serait probablement pas aussi peu dangereuse si l'amylolyse et la fermentation étaient effectuées dans des locaux insuffisamment ventilés. Il est aussi possible d'admettre qu'une faible partie de l'acide cyanhy-

drique pourrait être naturellement détoxiquée en donnant des cyanhydrines avec les groupes carbonylés des sucres réducteurs apparus au cours de l'hydrolyse enzymatique.

-:-

TROISIEME PARTIE

VARIATIONS DE LA TENEUR EN CONSTITUANTS PHOSPHORES ET EN INOSITOL AU COURS DE LA GERMINATION DES GRAINES DE SORGHO

CHAPITRE I

-:-

ETUDE DES VARIATIONS DES DIVERSES FRACTIONS PHOSPHOREES DES GRAINES DE SORGHO AU COURS DE LA GERMINATION

-:-

Nous avons dans ce chapitre tenté d'examiner quelles pouvaient être les principales modifications qu'entraîne la germination dans la répartition des principaux constituants phosphorés.

Les premières phases de la germination d'une graine s'accompagnent de changements profonds du métabolisme. On admet que dans les toutes premières heures de la germination, les composés lipidiques constituent le matériel dans lequel la future plante va puiser l'énergie nécessaire à son développement. Dès que la croissance de la plantule est suffisamment avancée, c'est-à-dire deux à trois jours après la cessation de la dormance, ce sont les dérivés glucidiques de réserve qui représentent les métabolites que la plante mettra à contribution pour poursuivre son développement. La transformation des molécules glucidiques exige le passage par une cascade d'intermédiaires phosphorylés. Chez de nombreux organismes, l'énergie nécessaire à l'accomplissement des phénomènes

vitaux et aux processus de la croissance est apportée par l'acide adénosine-triphosphorique (A.T.P.). Cette substance emmagasine l'énergie libérée par la décomposition des glucides et est susceptible de la rendre utilisable chaque fois que l'organisme en aura besoin. La resynthèse de l'A.T.P. consommé se réalise par un mécanisme du type glycolytique (chaîne d'Embden-Meyerhof).

Le rôle de nombreux dérivés de l'acide orthophosphorique au cours des processus métaboliques, bien connu chez les animaux et les microorganismes, a été relativement moins étudié chez les végétaux. Il est cependant permis de penser qu'un phénomène aussi actif que la transformation d'une graine dont le métabolisme est extrêmement ralenti en une plante qui croît doit s'accompagner de remaniements importants dans la distribution des divers constituants phosphorés de cette graine. Une étude de ces variations a déjà été effectuée par ALBAUM et UMBREIT (3) sur l'embryon d'Avoine. Au cours des pages qui vont suivre nous décrirons les variations que nous avons pu observer dans la répartition des dérivés phosphorés de la graine de Sorgho au cours de la germination. Ces expériences portent sur les fractions phosphorées acido-solubles de la graine. Le fractionnement de ces composés phosphorés a été opéré en s'inspirant de la technique préconisée par Le PAGE et UMBREIT (96). Il a été appliqué à la variété Fela blanc

de Sorghum cernuum (+) et mené parallèlement sur une quantité égale de graines non germées et de graines germées. Cette méthode de séparation est assez délicate et les opérations de fractionnement sont longues et laborieuses. Elle ne permet pas la récupération complète du phosphore total acido-soluble car dans les meilleures conditions opératoires on ne retrouve selon ALBAUM et UMBREIT que 95 p.cent environ du phosphore total.

Fractionnement des dérivés phosphorés acido-solubles des graines

On opère sur des lots de 20 g de graines non germées et de graines ayant germé pendant 4 jours. Les précautions à observer et la conduite de la germination sont les mêmes que celles qui ont été antérieurement décrites. Les graines sont broyées au "Turmix" et le produit obtenu est épuisé par 75 ml d'acide trichloracétique à 20 p.cent à trois reprises en s'aidant de l'agitation mécanique durant une heure pour chaque extraction. Entre chaque agitation, le récipient est abandonné une nuit au réfrigérateur à + 4°. Les fractions liquides sont recueillies par centrifugation et jointes les unes aux autres. Les culots de centrifugation sont exprimés et le liquide d'expression ajouté aux fractions liquides. Le volu-

---

(+) Le lot de graines utilisé dans les expériences décrites dans ce chapitre est différent de celui utilisé dans les expériences antérieures. Il nous a été indiqué qu'il devait s'agir de la variété Fela blanc sans qu'il soit possible d'être affirmatif.

me de liquide est finalement complété à 250 ml au moyen de la solution trichloracétique. Sur 20 ml du liquide on effectue le dosage du phosphore total acido-soluble par minéralisation sulfo-nitrique, isolement de l'acide orthophosphorique sous forme de sel ammoniaco-magnésien et colorimétrie selon la technique de Misson en opérant ainsi qu'il a déjà été dit auparavant.

Fractionnement proprement dit de la fraction phosphorée soluble dans l'acide trichloracétique

A) Séparation de la fraction barytique alcoolo-soluble et de la fraction barytique alcoolo-insoluble

Le reste de la fraction acido-soluble précédente est ajusté à pH 8,2 par addition de solution de potasse aqueuse à 50 p.cent en présence de phénol phtaléine. On ajoute alors une solution M/1 d'acétate de baryum [$Ba(CH_3CO_2)_2,2H_2O$ .PM=273] à raison de 1 ml (273 mg de sel) par milliatome de phosphore (31 mg), puis 4 volumes d'éthanol à 95°. On agite et laisse ensuite en contact durant 1 heure à la température du réfrigérateur. On centrifuge. La liqueur alcoolique surnageante est séparée, concentrée par distillation sous vide jusqu'à obtenir un volume d'environ 100 ml. Sur ce liquide on prélève une fraction aliquote pour déterminer le phosphore total et le phosphore minéral selon les techniques déjà exposées.

B) Fractionnement de la fraction barytique alcoolo-insoluble

Le précipité barytique insoluble dans l'alcool est traité par quelques ml d'acide chlorhydrique 2 N puis ajusté à pH 8,2 par la potasse. On ajoute alors un léger excès d'acétate de baryum. On laisse précipiter durant 1 heure au réfrigérateur. On centrifuge, la fraction surnageante constitue la fraction phosphorée barytique soluble. Le précipité est traité par l'acide chlorhydrique 2 N puis additionné d'une quantité suffisante d'acide sulfurique N/1 pour précipiter l'excès de baryum. On s'assure que la précipitation du baryum est totale en centrifugeant et ajoutant au surnageant une goutte d'acide sulfurique. Une nouvelle centrifugation permet la séparation du précipité de sulfate de baryum. Le précipité est lavé à trois reprises avec de l'eau distillée et les eaux de lavage sont réunies au surnageant.

Le liquide surnageant est ajusté à pH 8,2 puis additionné d'un léger excès de solution d'acétate de baryum. On centrifuge après précipitation complète. Le surnageant est joint à la fraction barytique soluble. Le précipité barytique est de nouveau décomposé comme il est dit plus haut et le baryum éliminé par l'acide sulfurique. On centrifuge, le surnageant ainsi séparé correspond à la fraction phosphorée barytique insoluble. Sur des parties aliquotes de cette fraction, on détermine le phosphore total après minéralisation, le phosphore minéral après séparation par la mixture magnésienne

et le phosphore phytique après minéralisation du phytate de fer comme il est dit dans la 1ère partie. Le schéma I résume les opérations de fractionnement du phosphore acido-soluble en trois fractions : alcoolo-soluble, barytique soluble et barytique insoluble. La répartition des constituants de chaque fraction est la suivante selon ALBAUM et UMBREIT :

Fraction barytique soluble : glucose 1 phosphate
fructose 6 phosphate
phosphopyruvate
acide adénosine monophosphorique
acide adénosine diphosphorique
Diphosphopyridine nucléotide
Triphosphopyridine nucléotide

Fraction barytique insoluble : Acide phytique
Phosphore minéral
Phosphoglycérate
Fructose 1-6 diphosphate
Acide adénosine triphosphorique

Fraction alcoolo-soluble : Non identifiée à des substances connues.

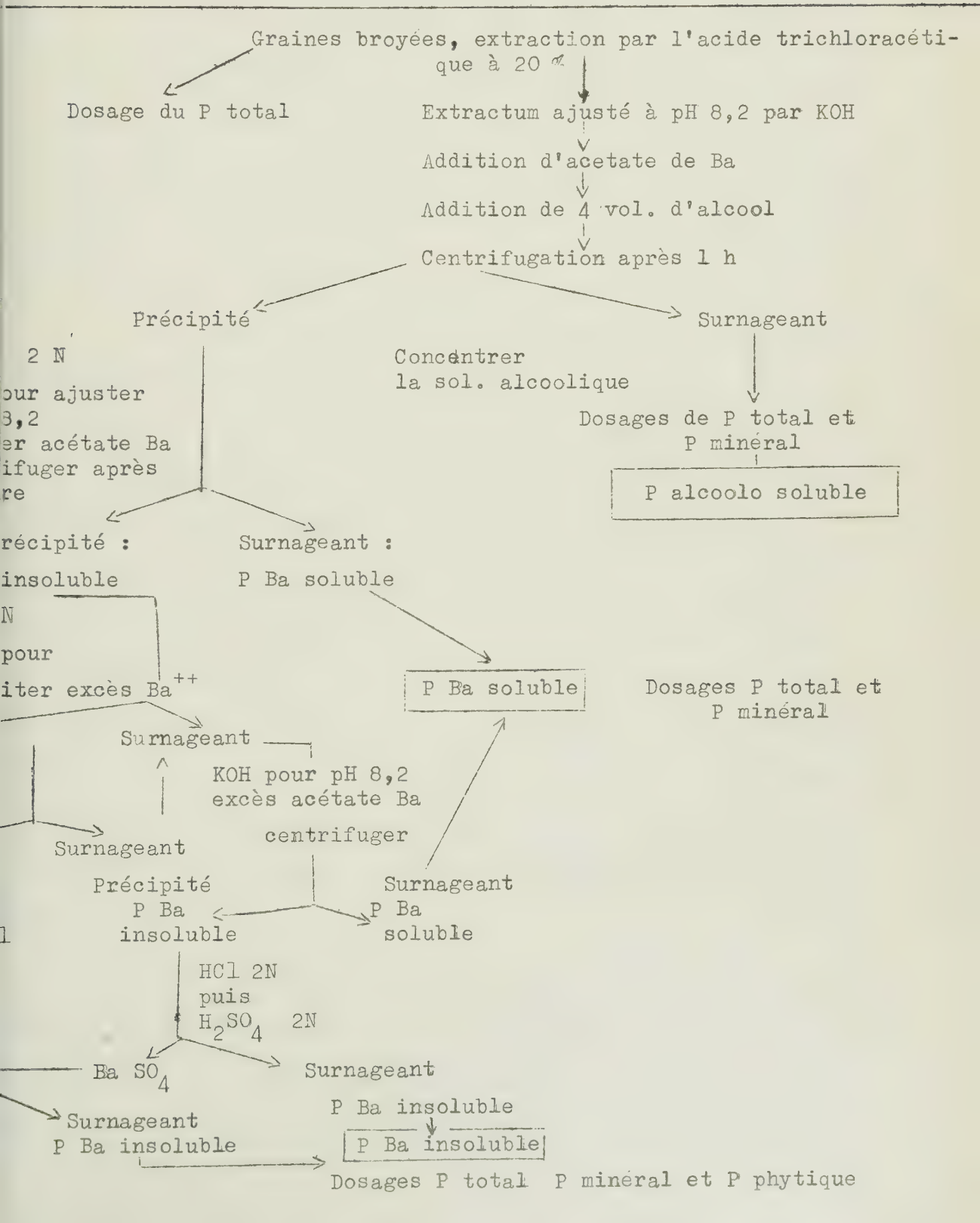
La répartition ainsi établie repose davantage sur des considérations théoriques que sur des résultats expérimentaux découlant d'analyses faites sur du matériel végétal. C'est

ainsi que dans la fraction barytique soluble, seul le fructo-se 6 phosphate a pu être identifié avec quelque certitude. Dans la fraction barytique insoluble, la présence de l'acide adénosine triphosphorique n'a pu être démontrée de manière irréfutable. Quant à la nature des constituants qui composent la fraction alcoolo-soluble, elle n'a pu être fixée avec précision.

(Voir Schéma I p.suivante)

Schéma I

Fractionnement des composés phosphorés acido-solubles



Résultats et Discussion

Avant de procéder à la discussion des résultats obtenus à la suite du fractionnement des composés phosphorés des graines de Sorgho avant et après germination, nous voudrions formuler quelques commentaires relatifs à la technique de fractionnement employée. Cette méthode est d'un maniement assez délicat et présente un certain nombre d'inconvénients qui en diminuent la précision.

C'est ainsi que la reprécipitation des solutions des précipités barytiques solubles et insolubles est extrêmement pénible du fait de la présence dans le milieu de grandes quantités de substances polyholosidiques : amidon et ses produits d'hydrolyse en particulier. La viscosité très élevée du mélange s'oppose à une bonne sédimentation des précipités. La centrifugation prolongée ne permet pas toujours de bonnes séparations même si l'on tente d'abaisser la viscosité par addition d'eau. Il a également été observé que les précipités de sulfate de baryum sont susceptibles d'adsorber une certaine proportion de matières polyholosidiques qui complique sérieusement l'extraction des dérivés phosphorés retenus par ces précipités.

En effet dans une série d'essais préliminaires, il avait pu être constaté que les précipités de sulfate de baryum résultant de la préparation de la fraction barytique insoluble ont la propriété de retenir assez énergiquement les dérivés

Tableau XII

Différences dans la répartition du Phosphore acido-soluble avant et après germination de 100 g de graines de Sorgho en mg de P p.100 g

Fractions	Sorgho non germé		Sorgho germé	
Phosphore total	366			
Phosphore acido-soluble	314		318	
	A	B	A	B
Phosphore barytique insoluble	269		275	
Phosphore phytique	243		195	
Phosphore minéral	35		90	
Total		278		285
Phosphore barytique soluble total	16		17	
Phosphore barytique minéral soluble	1,5		1,5	
Total		16		17
Phosphore alcoolo-soluble total	16		26	
Phosphore alcoolo-soluble minéral	<1		1,5	
Total		16		26
Somme des trois fractions	301	310	318	328

phosphorés : phosphore minéral et phosphore phytique. L'extraction du phosphore retenu par les précipités a été réalisée de la façon suivante : le précipité séché a été finement divisé puis soumis à une agitation mécanique de deux heures avec un léger excès d'acide sulfurique N/1. Après centrifugation, le surnageant a été recueilli et l'on y a dosé : le phosphore total, le phosphore phytique et le phosphore minéral. A titre d'exemple nous indiquerons qu'au cours de l'un de nos premiers essais, le phosphore retenu par le sulfate de baryum représentait, rapporté à 100 g de graines :
P total : 59 mg ; P phytique: 56 mg ; P minéral : 2 mg. En soumettant le précipité résiduel à une seconde extraction pratiquée dans les mêmes conditions, on a pu extraire une nouvelle quantité de phosphore correspondant à 12 mg de phosphore total.

Dans nos expériences, il a par la suite été tenu compte de ces observations et les quantités récupérées ont été ajoutées aux valeurs correspondantes de la fraction barytique insoluble. Malgré ces précautions il est probable qu'une faible proportion de phosphore échappe à la récupération. Au cours de leur étude sur les composés phosphorés de l'Avoine ALBAUM et UMBREIT ont signalé que des difficultés de cet ordre s'étaient présentées. En opérant avec ce type de fractionnement sur un mélange artificiel de dérivés phosphorés identiques à celui que l'on peut rencontrer chez les végétaux,

ces auteurs ont obtenu des valeurs déficitaires.

Il convient également de noter qu'une petite fraction du phosphore minéral, qui théoriquement devrait se trouver uniquement dans la fraction barytique insoluble, est présente dans les fractions barytiques soluble et alcoolo-soluble. Des quantités non négligeables de phosphore minéral ont également été trouvées dans ces deux fractions par ALBAUM et UMBREIT.

Examinons maintenant les résultats obtenus. Les variations quantitatives qui affectent les différentes fractions phosphorées avant et après germination de 4 jours sont indiquées dans le tableau XII.

Le phosphore total n'a été déterminé que sur les graines non germées. A moins d'admettre une possibilité d'excrétion par la plantule la quantité absolue de phosphore ne doit pas présenter de variations puisque la germination a été opérée sur un milieu ne comportant que du coton et de l'eau distillée stériles. La quantité relative de phosphore a obligatoirement diminué puisque la graine s'est transformée en plantule avec augmentation de poids.

I°- Phosphore acido-soluble

Le phosphore acido-soluble ne paraît pas subir de modifications quantitatives, la très faible différence entre les deux valeurs du tableau XII est vraisemblablement imputable aux erreurs d'expérience. Cette constance semble indiquer que la fraction phosphorée non acido-soluble qui est re-

présentée par le phosphore lipidique et le phosphore protéique (essentiellement nucléoprotéique) ne participe pas de façon directe aux réactions du métabolisme phosphoré tout au moins à la période à laquelle les graines germées ont été analysées. Il est aussi possible d'admettre que le phosphore lipidique et protéique est utilisé pour donner de nouveaux dérivés du même type également insolubles dans l'acide trichloracétique à froid.

2°- Phosphore barytique insoluble

La teneur en phosphore total de la fraction barytique insoluble demeure pratiquement constante, le faible écart constaté ne pouvant à notre avis être pris en considération si l'on tient compte des difficultés rencontrées au cours du fractionnement. Dans les colonnes B du tableau XII figurent les sommes représentées par le phosphore phytique + le phosphore minéral de cette fraction. On pourra ainsi comparer ces valeurs à celles qui ont été obtenues en déterminant le phosphore barytique insoluble total. Les valeurs du phosphore total barytique insoluble calculées par addition se montrent légèrement supérieures à celles résultant du dosage global. Nous pensons que cette différence par excès qui est en moyenne de 3,5 p.cent environ peut être attribuée à une surcharge du précipité de phytate de fer par du phosphate ferrique entraîné lors de la séparation de l'acide phytique ; malgré le lavage du précipité par l'acide chlorhydrique dilué il doit

subsister une certaine proportion de phosphore minéral adsorbée sur le phytate ferrique. Dans des essais effectués à propos d'expériences qui ne sont pas liées directement à ce travail, nous avons observé des faits qui plaident en faveur de cette explication. Un extrait trichloracétique de graines traité en milieu acide par le perchlorure de fer fournit un précipité de phytate de fer. Si on lave ce précipité à l'acide chlorhydrique dilué puis le décompose par la soude à froid, on constate que le phytate de sodium obtenu renferme des quantités non négligeables de phosphate de sodium. Ainsi les précipités de phytate de fer provenant d'extraits trichloracétiques d'Avoine ou de Sorgho renfermaient parfois jusqu'à 8 p.cent de phosphore minéral. Au contraire les précipités d'hydroxyde ferrique résultant de la réaction de double décomposition entre le phytate ferrique et la soude ne contenaient pas plus de 0,50 p.cent de phosphore total. Le phosphore minéral n'était pas présent en proportions dosables. Nous croyons pouvoir estimer que les déterminations du phosphore barytique insoluble total et les déterminations séparées des deux fractions sont suffisamment concordantes étant donné la précision relative des méthodes actuelles dont on dispose pour le dosage de l'acide phytique.

En ce qui concerne les deux constituants de la fraction barytique insoluble, ceux-ci représentent indéniablement les substances dont les variations quantitatives sont les plus nettes au cours de la germination. On observe une

augmentation marquée du phosphore minéral dont le taux est multiplié par 2,5 environ tandis que la teneur en acide phytique accuse une diminution sensible qui atteint 48 mg. Le phosphore phytique disparu est légèrement inférieur à la quantité de phosphore minéral qui apparaît. Il est permis de supposer que si l'acide phytique est bien la source principale du phosphore minéral, il n'est peut être pas le seul composé responsable de cette élévation marquée. Un fait analogue a déjà été décrit par ESSERY (62) qui a observé qu'au cours du maltage de l'orge germée, l'activité phytasique s'accroît mais que le phosphore minéral qui présente une très forte augmentation ne peut provenir uniquement de l'acide phytique dont les variations sont très modérées.

D'autres expériences réalisées sur le Blé par PEERS (112) conduisent à des remarques identiques : la germination du grain s'accompagne d'une forte élévation de l'activité phytasique mais le taux d'acide phytique ne diminue qu'assez faiblement en sorte que cette substance ne peut représenter qu'une fraction modeste de la quantité de phosphore minéral qui apparaît au cours du phénomène. Dans les expériences décrites dans la 2e partie, il a été indiqué que l'activité phytasique pratiquement nulle dans la graine non germée apparaît et augmente progressivement dans les premiers jours de la germination. Les divers échantillons de Sorgho examinés au quatrième jour renfermaient une quantité de phosphore minéral représentant de 40 à 66 p.cent environ du phosphore acido-

soluble. Dans le cas du Sorgho Fela blanc utilisé dans les essais de ce chapitre, le phosphore minéral présent à la même période constitue plus de 28 p.cent du phosphore acido-soluble. Même si tout le phosphore minéral ne peut être considéré comme résultant d'une hydrolyse enzymatique de l'acide phytique, il est intéressant de noter que des graines dont l'activité phytasique est fort différente avant germination manifestent au cours de cette dernière des activités dont les écarts sont beaucoup moins accentués . L'activité phytasique de la graine au repos ne permet pas de préjuger du sort que subira l'acide phytique au moment de la germination.

3°- Phosphore barytique soluble

La fraction barytique soluble ne présente pratiquement pas de variations quantitatives appréciables au cours de la germination. Elle correspond à environ 4,4 p.cent du phosphore total et à 5,6 p.cent de la fraction acido-soluble. Il est vraisemblable qu'elle subit des modifications quantitatives qui touchent les proportions respectives de ses divers constituants. C'est en effet dans cette fraction que se rencontrent une partie des esters phosphoriques qui participent aux diverses réactions du métabolisme glucidique ainsi que les coenzymes pyridiniques qui sont impliqués dans les réactions de transfert de l'hydrogène qui conditionnent l'utilisation du glucose. On pourra observer que la fraction barytique soluble renferme une faible quantité de phosphore minéral dont la quantité absolue est d'ailleurs constante avant

et après germination, tandis que le pourcentage relatif est abaissé dans le cas des graines germées. La présence de phosphore minéral dans la fraction envisagée n'est pas seulement le fait de la graine de Sorgho car ALBAUM et UMBREIT ont aussi pu mettre en évidence ce composé dans le cas de la graine d'Avoine. Ils attribuent ce phénomène à la rétention de phosphates par l'amidon. La diminution relative pourrait résulter de la disparition progressive de l'amidon au fur et à mesure que la germination se poursuit.

4°- Phosphore barytique alcoolo-soluble

La fraction barytique alcoolo-soluble est aussi de celles dont les variations sont les plus marquées au cours d'une période de germination de 4 jours. Alors que son taux est égal à celui de la fraction barytique soluble dans la graine intacte, après 4 jours le phosphore barytique alcoolo-soluble s'est accru de plus de 60 p.cent. Cette augmentation a aussi été observée dans le cas de l'Avoine germée mais ALBAUM et UMBREIT n'ont pu identifier les constituants de cette fraction à des dérivés phosphorés connus. Il est à remarquer ici encore qu'une faible proportion de phosphore minéral entre dans la constitution de la fraction alcoolo-soluble. La présence de phosphates minéraux dans cet extrait résulte d'une légère solubilisation du phosphate de baryum par l'alcool, la quantité utilisée de ce solvant étant assez importante : à peu près 1 litre d'alcool en présence de moins de

20mg de phosphore minéral dans la prise d'essai utilisée pour cette manipulation.

Conclusion

Les résultats des déterminations effectuées sur les trois fractions phosphorées de l'extrait trichloracétique de graines avant et après germination de 4 jours peuvent se résumer ainsi. Le phosphore acido-soluble ne présente pas de variations sensibles, il en est de même de la fraction barytique insoluble et de la fraction barytique soluble. La seule fraction dont le changement se traduit par une augmentation appréciable correspond à la fraction alcoolo-soluble qui de toute façon ne figure que pour un faible pourcentage dans le phosphore total. Au sein de la fraction barytique insoluble, la diminution de la teneur en acide phytique paraît insuffisante pour expliquer l'accroissement de la quantité de phosphore minéral apparue dans la germination.

Ces déterminations se montrent donc insuffisantes pour se rendre compte du sort des constituants phosphorés de la graine lors de la germination ; c'est à l'intérieur de chaque fraction qu'il faudrait procéder à des séparations poussées et au dosage des différents composants mais la nature complexe du matériel qui renferme encore des substances mal identifiées exige la mise en oeuvre de techniques suffisamment précises pour pouvoir saisir des variations quantitatives portant sur des substances fragiles dont la séparation dans des

mélanges artificiels n'est pas toujours pleinement satisfaisante. L'alternance des traitements acides et alcalins est peut être susceptible de provoquer l'hydrolyse d'un certain nombre d'esters phosphoriques particulièrement labiles ce qui donnerait en définitive une image inexacte de la répartition de ces composés in vivo.

-:-

CHAPITRE II

-:-

ETUDE DES VARIATIONS DE L'INOSITOL LIBRE AU COURS DE LA GERMINATION

-:-

Au cours des chapitres précédents nous avons pu montrer que la germination de la graine de Sorgho s'accompagne :

I°- d'une augmentation très nette de l'activité phytasique-celle-ci étant considérée comme pratiquement inexistante dans les graines non germées lorsqu'on cherche à la déceler par les techniques habituelles.

2°- d'une diminution marquée de la teneur en acide phytique.

3°-d'une libération importante de phosphates minéraux.

Ces trois observations devaient logiquement nous amener à suivre les variations de la teneur en méso-inositol des graines de Sorgho avant et après germination afin de pouvoir examiner s'il existe un parallélisme entre l'élévation du taux de phosphore minéral et l'apparition éventuelle de nouvelles quantités d'inositol libre. Quelques expériences de BURKHOLDER (25) ont permis de constater que la transformation de la graine en plantule chez les Graminées alimentaires (Avoine, Blé, Orge, Maïs) se traduit par une hausse de la te-

neur en méso-inositol, mais le phénomène étudié dans le cadre d'un travail sur les vitamines n'a pas été examiné comparativement avec les variations du contenu phosphoré. Alors que depuis une quinzaine d'années, les recherches consacrées à la biochimie de l'inositol chez les animaux supérieurs et chez les micro-organismes se sont développées de manière importante, celles qui touchent aux végétaux ne semblent pas avoir été l'objet du même intérêt.

Répartition de l'inositol dans le règne végétal

Découvert en 1850 par SCHERER dans le muscle de Boeuf, le méso-inositol a été mis en évidence six ans plus tard par VOHL dans le Haricot vert et par la suite, il a été trouvé dans un très grand nombre de végétaux. Les recherches de G. MEILLERE, à partir de 1906, montrèrent qu'il est présent dans les divers organes et tissus des plantes supérieures : feuilles, tiges, fruits, graines, racines ... aussi bien chez les végétaux chlorophylliens que chez ceux qui sont dépourvus de ce pigment, mais la localisation cellulaire n'est pas encore connue avec précision. Dès 1908 MEILLERE admettait l'ubiquité de ce cyclitol qui, disait-il, peut toujours être décelé dans les tissus à condition d'opérer l'extraction sur une quantité suffisante de matière première. Chez les végétaux l'inositol se rencontre sous deux états : à l'état libre et à l'état de combinaisons hydrosolubles ou non. L'inositol libre

est présent dans la plupart des tissus mais les feuilles, les racines, les fruits et le pollen apparaissent en général mieux pourvus que les graines et le bois. Les teneurs moyennes oscillent entre 1,5 et 8 mg par gramme de tissu sec. D'autres cyclitols isomères ou des dérivés de ces derniers ont également été extraits de divers tissus végétaux (pinitol, québrachitol, viburnitol, laminitol). L'inositol combiné est principalement représenté par des esters orthophosphoriques dont le plus abondant est l'ester hexa-phosphorique, salifié par le calcium, le magnésium et secondairement le potassium, qui constitue on le sait l'acide phytique formant le globoïde des grains d'aleurone microscopiquement visible dans de nombreuses graines, POSTERNAK (120). D'autres esters phosphoriques de l'inositol ont également été mis en évidence plus récemment dans certaines fractions de divers phospholipides retirés des végétaux, mais ils ne se trouvent jamais en quantité aussi importante que l'acide phytique. Nous reviendrons plus loin sur ces fractions lipidiques que nous avons pu déceler dans l'huile de graines de Sorgho. Il a également été signalé dans la mélasse de Betterave l'existence d'un galactoside de l'inositol, le galactinol, isolé par BROWN et SERRO (23) et dont KABAT et ses collaborateurs (92) ont pu établir la constitution ; il s'agit de l'α-D galactopyranosido 1 $\rightarrow$ 1' méso-inositol qui, présent en quantité supérieure au raffinose, n'a pas à notre connaissance été rencontré ailleurs. Il n'est pas impossible qu'il puisse également exister des

dérivés protéiques de l'inositol, certains ont été décrits dans les tissus animaux comme le cerveau par FOLCH (94) et BRUCE (24) a pu montrer que l'inositol est capable de contracter des liaisons avec les protéines.

Choix d'une méthode de dosage de l'inositol libre

A l'exception des oxydants énergiques qui parviennent à attaquer la molécule de méso-inositol, cette substance présente la regrettable particularité d'une grande stabilité due à son inertie relative vis-à-vis de la plupart des réactifs. Ce manque de réactivité a fait longtemps obstacle à la détermination précise et spécifique du méso-inositol présent au sein de milieux biologiques complexes.

L'oxydation periodique de l'inositol étudiée par FLEURY et ses élèves : Melle Joly, Lange, Mme Fievet-Guinard et enfin Recoules (70) permet la détermination de l'inositol en milieu pur et en particulier en l'absence de glucides. La consommation d'acide periodique ou la mesure de l'anhydride carbonique libéré fournissent une estimation précise. Cette technique devient difficilement applicable lorsque le milieu n'est pas suffisamment débarrassé des autres substances oxydables par le réactif. Une méthode spectrophotométrique récente (95) rend possible le dosage de petites quantités d'acide periodique, ce qui permet un micro-dosage de l'inositol dans les solutions privées de substances contaminantes. A no-

tre entrée au Laboratoire de chimie biologique de la Faculté de Pharmacie, les Professeurs FLEURY et COURTOIS nous engagèrent à examiner la possibilité de doser l'inositol en mesurant colorimétriquement l'acide glycolique qui apparaît au cours de l'oxydation periodique de ce cyclitol et également au cours de l'oxydation periodique d'autres substances polyhydroxylées (fructose, maltose, lactose ...). Dans ce but avec FLEURY et COURTOIS (71) nous avons mis au point une semi-micro méthode photométrique de détermination de l'acide glycolique. Cette technique est basée sur le développement d'une coloration violette qui apparaît lorsque l'on chauffe l'acide glycolique avec une solution d'acide chromotropique en présence d'acide sulfurique concentré. La coloration se rapproche de celle que fournit à froid le formaldéhyde, EEGRIWE (60).

Cette méthode, moyennant un blocage du formaldéhyde par le sulfate d'ammonium et une extraction de l'acide glycolique par l'éther, rend possible le dosage de l'acide glycolique formé au cours des oxydations periodiques, même s'il apparaît simultanément du formaldéhyde dans la réaction (72). Ce procédé de mesure de l'acide glycolique est maintenant utilisé de manière habituelle dans ce Laboratoire lorsque l'on veut rechercher ou déterminer l'acide glycolique apparaissant lors de l'oxydation periodique de diverses substances polyhydroxylées. Malheureusement nos essais d'application au cas

particulier du méso-inositol ne nous ont pas permis de retenir cette technique pour le dosage de ce cyclitol et ce pour les raisons que nous allons indiquer.

A l'origine de cette tentative de détermination de l'inositol à partir de l'acide glycolique qu'il produit lorsqu'on le soumet à l'oxydation periodique se trouvent les recherches de FLEURY, POIROT et FIEVET-GUINARD (66) (69). Ces auteurs entre 1945 et 1947 avaient pu montrer que l'oxydation d'une mólécule d'inositol par l'acide periodique à froid donne naissance à environ 0,8 molécule d'acide glycolique lequel est ensuite difficilement oxydable.

Ayant de notre côté soumis l'inositol à l'oxydation periodique soit à + 4° soit à 37° pendant des temps variables de cinq minutes à 48 heures nous avons été surpris de constater que les quantités d'acide glycolique qui apparaissaient se montraient très inférieures à celles que l'on pouvait attendre. Suivant nos conditions opératoires ces quantités étaient comprises entre 0,04 et 0,085 molécules soit de dix à vingt fois plus faibles que ce que l'on prévoyait. Devant ces divergences nous fîmes part au Professeur FLEURY de nos résultats. Ce dernier avec L. Le DIZET se proposa de reprendre de façon approfondie l'oxydation periodique de l'inositol afin de tenter d'expliquer ces différences. L'étude détaillée de ces auteurs, qui confirme nos premiers résultats, est relatée dans un mémoire (74). Pour expliquer les faibles teneurs en

acide glycolique des solutions d'inositol soumises à l'oxydation periodique nous avons pensé que l'acide glycolique apparu pouvait à son tour subir une oxydation plus marquée que celle observée par FIEVET-GUINARD. Cet auteur admettait que l'acide glycolique s'oxydait lentement à froid en libérant de l'acide formique et de l'anhydride carbonique, la réaction s'arrêtant avant la disparition totale de l'acide glycolique. Il n'y avait pas production de formaldéhyde comme le laissait cependant prévoir le processus classique d'oxydation d'une telle substance, c'est seulement au cours d'oxydation à chaud que le formaldéhyde prenait naissance. Reprenant l'oxydation periodique de l'acide glycolique dans diverses conditions nous avons pu constater la formation de formaldéhyde au cours d'oxydations de 24 heures à la température de 20° ou 37°. Par la suite avec FLEURY, COURTOIS et L. Le DIZET (73) nous avons pu montrer qu'il est possible d'oxyder pratiquement totalement l'acide glycolique et que la réaction obéit à un mécanisme complexe pour lequel nous avons proposé un schéma.

Ces divergences relatives aux modalités de l'oxydation periodique de l'inositol et de l'acide glycolique peuvent vraisemblablement trouver une explication dans le fait que les premières expériences de FIEVET-GUINARD ont été effectuées durant la dernière guerre, époque à laquelle la qualité des réactifs laissait souvent à désirer. La présence d'impuretés dans ces derniers pourrait être rendue responsable des modali-

tés observés au cours du processus oxydatif. Quoiqu'il en soit les trop faibles quantités d'acide glycolique qui prennent naissance lors de l'oxydation periodique de l'inositol devaient nous contraindre à l'abandonner l'espoir de pouvoir doser ce dernier au moyen de la réaction à l'acide chromotropique.

Devant les difficultés présentées par les méthodes chimiques de détermination nous nous tournâmes alors vers les méthodes microbiologiques. Celles-ci sont fondées sur le caractère de facteur de croissance du méso-inositol vis-à-vis d'un certain nombre de micro-organismes. Dans une revue générale que nous avons publiée avec P. MALANGEAU et M.C. COLAS (102) nous avons indiqué les principales possibilités offertes par ce type de méthode dont WOOLLEY fut le premier à proposer l'utilisation. Notre choix s'est porté sur Neurospora crassa dont le mutant "inositol less" a fourni à SCHOPFER et Collab. (131) une élégante technique gravimétrique très sensible et spécifique et qui n'a, à notre avis, qu'un seul inconvénient : son manque de rapidité. Nous l'employons depuis une dizaine d'années ayant pu l'adapter au dosage de l'inositol dans divers milieux biologiques : urine (46), sang (115), détermination de la clearance rénale de l'inositol (116). Nous n'en décrirons ici que le principe car l'étude détaillée du protocole à été précisée dans nos publications antérieures ainsi que dans les thèses d'HELLEU (85) et de COLAS (27). La croissance du mutant inositol-less de Neurospora crassa sur

milieu assez simple minéral et organique n'est possible
l'en présence de méso-inositol à l'exclusion des autres iso-
res. Dans certaines limites de concentration en inositol la
croissance du micro-organisme est proportionnelle à la teneur
inositol du milieu. Dans une série de fioles de milieu en-
mencé avec une suspension de spores de Neurospora, on
joute des quantités croissantes d'inositol comprises entre 0
35 µ g dans la prise d'essai. Après 4 jours de culture en-
re 26° et 28° à l'obscurité, le thalle qui s'est développé
st recueilli sur filtre taré, lavé, séché et pesé. Le tracé
la courbe représentant le poids de thalle en fonction de
a concentration en inositol permet la détermination de la te-
eur en inositol libre de solutions de titre inconnu traitées
ans les mêmes conditions que les solutions de référence.
haque détermination est effectuée sur trois parties aliquotes
ifférentes de la solution à doser afin de diminuer les erreurs
mputables aux irrégularités des courbes que l'on peut parfois
bserver.

Extraction de l'inositol libre des graines

L'opération est menée sur des lots de 20 g de graines
on germées pulvérisées au broyeur "Turmix" et sur des lots
e 20 g de graines soumises à la germination dans les condi-
ions déjà précisées antérieurement. Avant de subir l'extrac-
ion les graines germées sont portées à l'étuve à 90° pendant

l heure. Cette opération a pour but de réaliser une déshydratation partielle tendant à réduire l'abaissement du titre alcoolique du solvant utilisé pour l'extraction. De la sorte les protocoles opératoires pratiqués pour les deux catégories de graines peuvent être considérés comme pratiquement identiques. Après dessiccation partielle les graines germées sont broyées au "Turmix" jusqu'à obtention d'une pâte encore assez grossière que l'on triture ensuite au mortier pour la rendre plus homogène. Les produits ainsi obtenus sont disposés dans une cartouche de cellulose et l'on procède à l'extraction dans un appareil de Kumagawa en utilisant comme solvant 200 ml d'alcool à 80° bouillant. L'opération est renouvelée trois fois avec une quantité égale de solvant neuf. Les fractions alcooliques réunies sont filtrées aussitôt après avoir été portées à l'ébullition. L'inositol est en effet d'autant plus soluble dans l'alcool que le titre alcoolique est plus bas et que la température est élevée. Le titre alcoolique de 80° a été choisi pour entraîner le moins possible de substances hydrosolubles. Il n'a pas été procédé à la défécation des extraits par le sous-acétate de plomb. Cette méthode, qui consiste à traiter les extraits par le sous-acétate de plomb puis l'ammoniaque, précipite l'inositol sous forme de dérivé plombique qu'un traitement par l'acide sulfurique ou l'hydrogène sulfuré convertit en inositol libre. En effet, nous avons systématiquement voulu écarter les techniques faisant usage

de métaux lourds dont des traces risquaient ultérieurement d'entraver la détermination microbiologique. Les solutions alcooliques d'extraction se présentent sous forme d'un liquide limpide coloré en rouge-violacé par les pigments de la graine. Les solutions sont concentrées par distillation sous vide jusqu'à obtenir environ 100 ml. La liqueur rouge est transvasée dans un cristallisoir et l'on termine la concentration sur le bain-marie bouillant jusqu'à obtenir un résidu sec. Ce résidu est une masse rouge-noirâtre à consistance un peu élastique ; il est surtout constitué par des prolamines solubles dans l'alcool à 70° et un peu de matière grasse. La masse est triturée soigneusement avec un peu d'éther éthylique employé par petites fractions afin de réaliser un dégraissage partiel. La phase éthérée est éliminée et l'on sèche à nouveau en portant sur le bain-marie bouillant. Il reste finalement un résidu écailleux fortement pigmenté que l'on gratte et pulvérise au mortier. La poudre obtenue est épuisée à plusieurs reprises par l'eau bouillante. Les diverses fractions aqueuses filtrées sont réunies et l'on complète le volume final à 150 ml. La solution est ensuite soumise à une stérilisation à l'autoclave à 115° pendant 20 minutes, précaution indispensable pour la détermination microbiologique.
En plus de la détermination microbiologique de l'inositol une partie aliquote de la solution est utilisée pour déterminer le phosphore total et le phosphore minéral entraînables par l'extraction alcoolique. Ces dernières mesures ont en ef-

'et été effectuées sur certains échantillons car nous avions
)u observer que les extractums alcooliques repris par l'eau
'enfermaient une quantité non négligeable de dérivés phosphorés
.écelables par simple mélange d'une fraction de la solution
:queuse avec du réactif de Misson. Les dosages du phosphore
.otal et minéral ont été effectués par les techniques déjà
décrites. Parallèlement à ces déterminations on a effectué le
dosage de l'inositol phytique en procédant à l'extraction
:richloracétique et à la précipitation par le perchlorure de
fer de lots de graines germées ou non germées, le dosage du
)hosphore du précipité de phytate de fer permettant de cal-
:uler la quantité théorique d'inositol estérifié, 1 molécule
l'inositol (PM 180) correspondant à 6 atomes de phosphore
PM 31 x 6 = 186).

Résultats et Discussion

Les résultats de nos déterminations sont consignés dans
.e tableau XIII. La méthode que nous utilisons pour l'extrac-
:ion n'est certainement pas parfaite et l'on ne peut affirmer
que la totalité de l'inositol libre passe dans l'extrait al-
:oolique. Elle ne fournit pas des valeurs plus faibles cepen-
dant que celles que l'on peut trouver dans la littérature à
)ropos d'autres Graminées. Nous avons d'ailleurs pu nous li-
'rer à une comparaison en employant pour quelques essais des
graines d'Avoine non germées et germées traitées selon notre

technique d'extraction. DARBRE (52) qui a étudié l'inositol libre et total de l'Avoine avant et après germination et dosé ce cyclitol après extraction par l'acide chlorhydrique 0,04 N en utilisant la technique microbiologique au Saccharomyces pombe indique les valeurs suivantes : Avoine non germée : inositol libre 8,5 mg pour 100 g, Avoine germée de 6 jours : 12,6 à 20,4 mg. pour 100 g. De notre côté sur l'Avoine blanche Bersée nous avons obtenu : avant germination 13,2 à 13,5 mg. D'après DARBRE, l'inositol total dosé après autolyse et extraction chlorhydrique représente 265 à 269 mg pour 100 g d'Avoine non germée ; les essais effectués pour notre part fournissent des valeurs comprises entre 250 et 255 mg pour 100 g.

BURKHOLDER (25) a également procédé au dosage de l'inositol total de quatre graines de Graminées avant et après germination de 5 à 6 jours. L'inositol est évalué par une technique microbiologique après incubation des tissus broyés avec un mélange de papaïne et de taka-diastase. Ses résultats sont rapportés au poids sec. Il constate une élévation de la teneur en inositol total dans les graines germées. Cependant les valeurs obtenues sont difficiles à prendre en considération car elles nous semblent 5 à 7 fois trop faibles. Cela est vraisemblablement dû au fait qu'il n'est effectué qu'une extraction rudimentaire et aussi à ce que la papaïne et la taka-diastase ne réalisent dans les conditions opératoires qu'une hydrolyse partielle du contenu cellulaire et de l'acide phyti-

que.

Tableau XIII

Variations de l'Inositol au cours de la germination en mg pour 100 g de graines

	Avant germination	Germination de 4 jours	Germination de 8 jours
Inositol libre	6	17	41
Inositol phytique calculé d'après la teneur en acide phytique	235	189	160
Inositol "total"	241	206	201
Phosphore total de l'extrait aqueux final	5,9	31	
Phosphore minéral de l'extrait aqueux final	3,1	22	

Nos examens relatifs à la teneur en inositol du Sorgho non germé et germé conduisent à formuler les remarques suivantes :

La teneur en inositol libre du Sorgho s'élève de façon importante au cours de la germination ; alors que dans la graine en dormance, l'inositol libre ne figure que pour 2,5 p.cent environ de l'inositol total, après 8 jours de germination l'inositol libre représente au moins 20 p.cent de l'inositol total. Pendant la même période l'inositol combiné sous forme d'acide phytique subit une diminution marquée atteignant environ 16,5 p.cent. L'ensemble se traduit par une baisse de

l'inositol total et une élévation de la teneur en inositol libre. Ces faits peuvent être rapprochés des observations de DARBRE qui a pu noter pour l'Avoine des variations dans le même sens. Dans nos expériences, l'inositol phytique s'est abaissé de 75 mg en 8 jours tandis que l'inositol libre s'est accru de 35 mg durant la même période. Cela nous conduit à supposer qu'une fraction de l'inositol libéré par l'hydrolyse phytique ne se retrouvant pas sous forme d'inositol libre a du être utilisé par la plante pour élaborer de nouveaux constituants nécessaires à sa croissance. Alors que nos connaissances sur le métabolisme de l'inositol chez les animaux et les micro organismes commencent à s'établir sur des bases solides grâce à l'utilisation d'inositol marqué en diverses positions par le carbone 14C , le deutérium et le tritium, les renseignements concernant le métabolisme de l'inositol chez les végétaux supérieurs restent très rudimentaires. L'isomérie des formules brutes de l'inositol et des hexoses et une certaine analogie entre les formules développées, en particulier l'accumulation des fonctions hydroxylées, ont depuis longtemps permis de supposer que les hexoses et l'inositol pouvaient être interconvertibles. Le passage de l'inositol au glucose par l'intermédiaire de l'acide D glucuronique et de la voie des pentoses de Dickens-Horecker est aujourd'hui démontrée grâce en particulier aux travaux de CHARALAMPOUS qui ont été relatés dans notre revue (103). Chez les végétaux inférieurs

comme Penicillium chrysogenum, il a été démontré que l'inositol pouvait conduire au glucose, IRANI et GANAPATHI (89).

Ainsi que le suggérait déjà CRATO en 1892 (50), l'inositol participe à la biogenèse des noyaux aromatiques qui sont synthétisés chez les micro-organismes et les végétaux à partir de composés hydro-aromatiques comme les acides quinique et shikimique. Les amino-acides aromatiques et hétérocycliques, les tanins paraissent ainsi susceptibles d'être fabriqués à partir de l'inositol (103). Les données fragmentaires relatives à l'utilisation de l'inositol dans la génèse de divers constituants biologiques fournissent cependant des arguments qui peuvent expliquer la disparition d'une fraction notable de ce cyclitol au cours des premières phases de la croissance.

Ainsi que nous le laissions entendre plus haut, les extraits alcooliques de graines repris par l'eau renferment des dérivés phosphorés. Les valeurs indiquées dans le tableau XIII montrent que le phosphore total et le phosphore minéral sont plus abondants dans les extraits de graines germées que dans ceux de graines avant germination. L'augmentation du phosphore minéral atteint sept fois le taux primitif tandis que celui du phosphore total est seulement multiplié par cinq, après 4 jours de germination. Pendant la même période le taux d'inositol libre s'est accru de 11 mg ; en considérant que cet inositol provient uniquement de l'hydrolyse de l'acide phytique il ne devrait apparaître dans ces conditions que

11,3 mg de phosphore minéral. Ce fait paraît confirmer indirectement les résultats relatés au chapitre précédent, à savoir que le phosphore minéral qui apparaît au cours de la germination ne provient pas uniquement de la scission de l'acide phytique.

-:-

QUATRIEME PARTIE

ETUDE DE LA FRACTION LIPIDIQUE DES GRAINES DE SORGHO

MISE EN EVIDENCE D'UN PHOSPHOLIPIDE RENFERMANT DE L'INOSITOL

ETUDE DE LA FRACTION LIPIDIQUE DES GRAINES DE SORGHO. MISE EN EVIDENCE D'UN PHOSPHOLIPIDE RENFERMANT DE L'INOSITOL

-:-

Ainsi que nous l'avons indiqué dans le chapitre précédent, l'acide phytique n'est pas le seul ester phosphorique de l'inositol susceptible de se rencontrer chez les végétaux. En effet depuis la mise en évidence par R.J. ANDERSON en 1930 de phospholipides à inositol dans le bacille tuberculeux, plusieurs équipes de chercheurs ont pu extraire et déterminer la structure de phospholipides à inositol (phosphoinositides ou inosito-phosphatides) dans diverses graines. Les premiers KLENK et SAKAI en 1939 décrivirent l'inositophosphatide des graines de Soja. Plus récemment, les inositophosphatides de la levure (HANAHAN et OLLEY), du germe de Blé et de l'Arachide (FAURE et MORELEC-COULON), du Pois (WAGENKNECHT, LEWIN et H. CARTER) ont fait l'objet de travaux détaillés. A côté de ces substances de structure relativement simple, on a décrit des corps plus compliqués. Le Soja a livré à MALKIN et POOLE un glycéroinositophosphatide renfermant de l'éthanolamine et un triholoside. Les graines de Blé, Coton, Arachide et Soja contiennent un phospholipide très complexe se rattachant

aux sphingolipides ; il fournit à l'hydrolyse de la phytosphingosine, de l'inositol, des oses, de la glucosamine, de l'acide glucuronique, de l'acide phosphorique et des acides gras (CARTER et Collab.).

Les principales acquisitions concernant les inositophosphatides ont été résumées dans nos deux revues avec MALANGEAU et COLAS (103) (104) ainsi que dans la mise au point de HAWTHORNE (84).

Il nous a paru intéressant de rechercher si la graine de Sorgho renfermait elle aussi une fraction phospholipidique à inositol. Dans les pages qui vont suivre nous exposerons le travail que nous avons entrepris sur les lipides de la graine de Sorgho non germé.

Propriétés et méthodes de séparation des phospholipides (136)

D'une manière générale les phospholipides sont solubles dans le chloroforme, le benzène, l'éther de pétrole, l'éther éthylique légèrement hydraté (à l'exception des sphingolipides) ; ils sont insolubles dans l'acétone. Les inositophosphatides se distinguent en sus de leur insolubilité dans l'acétone par leur insolubilité dans le méthanol et l'éthanol. Ils correspondent à la fraction "céphaline" insoluble dans l'alcool de la méthode de fractionnement de FOLCH (76). En effet lorsque l'on procède au fractionnement des phospholipides par le méthanol ou l'éthanol à froid on obtient une frac-

tion soluble dans l'alcool (fraction lécithinique) et une fraction insoluble dans l'alcool ou fraction céphalinique qui renferme la phosphatidyl-éthanolamine, la phosphatidyl-sérine et les inositophosphatides. Quand à une solution chloroformique de phospholipides totaux, on ajoute progressivement de l'éthanol ou du méthanol on constate que la fraction qui précipite la première correspond aux inositophosphatides car ces derniers sont moins solubles dans les alcools que la phosphatidyl-éthanol-amine et la phosphatidyl-sérine. Les précipités que l'on recueille ne sont pas purs en raison des co-précipitations dues à des phénomènes de solubilisations réciproques. La purification de ces produits est en outre particulièrement difficile. Beaucoup de ces phospholipides à inositol décrits dans la littérature sont en fait hétérogènes, leur structure ne peut être établie avec quelque certitude que lorsqu'ils ont été hautement purifiés. D'après HAWTHORNE, les techniques qui permettent de séparer les phospholipides associés entre eux dans les mélanges naturels sont encore imparfaites. Aucune des méthodes actuellement utilisées ne peut permettre une étude quantitative directe. La complexité des mélanges naturels est telle que certains constituants échappent parfois aux premières études analytiques tandis que des artéfacts ou des produits de contamination viennent fausser les résultats. C'est ainsi que dans le premier travail d'ANDERSON, l'inositol fut d'abord confondu avec un acide organique. L'acide tartri-

que décelé dans l'inositophosphatide du Soja par WOOLLEY est aujourd'hui considéré comme un artéfact apparu au cours de l'hydrolyse car il n'a jamais été retrouvé dans les recherches ultérieures.

Extraction et fractionnement des lipides de la graine de Sorgho

A) Extraction

Cent grammes de farine de graine de Sorgho Fela blanc sont mis à macérer pendant 24 heures à la température du laboratoire dans 200 ml d'un mélange à parties égales de chloroforme et de méthanol. Le méthanol comme l'éthanol assure la rupture des liaisons que peuvent contracter les lipides avec les protéines. La macération préalable facilite l'extraction ultérieure. Après 24 heures de contact le liquide rouge obtenu est filtré sur papier et la farine humide est disposée dans la cartouche d'un extracteur de Kumagawa. On réalise une extraction de 4 heures en utilisant comme solvant le mélange ayant servi à la macération. Deux nouvelles extractions de 4 heures sont effectuées avec 100 ml de solvant neuf à chaque fois. Les liquides d'extraction sont réunis et filtrés sur papier. Le filtre est lavé avec 50 ml de chloroforme bouillant et le filtrat est joint au liquide précédent. Le solvant est évaporé dans un bécher disposé sur un bain-marie bouillant. Au résidu on ajoute un peu d'alcool méthylique et l'on évapore à nouveau, ce qui entraîne une partie de l'eau

retenue par le résidu. On termine l'évaporation par un séjour d'un quart d'heure à l'étuve à 100°-105°. Le résidu terminal se présente comme une masse rougeâtre solide; il renferme en dehors des lipides une proportion importante de prolamines entraînées par l'alcool et le pigment rouge de la graine. Le résidu est ensuite soumis à une purification partielle. La masse est reprise par 50 ml d'éther de pétrole chaud employé en plusieurs fois. Les solutions éthéro-pétroliques sont réunies. Le résidu en partie dégraissé est récupéré par grattage des parois du bécher, transvasé dans un mortier et pulvérisé. On épuise la poudre à plusieurs reprises par l'éther de pétrole bouillant. Les solutions éthéro-pétroliques réunies sont filtrées sur filtre sans cendres et le filtre est lavé 4 fois par l'éther de pétrole bouillant. Le solvant de lavage est joint à la solution dans l'éther de pétrole. On évapore à sec dans un bécher taré, d'abord au bain-marie bouillant puis à l'étuve à 100° pendant un quart d'heure. On abandonne le récipient pendant 24 heures dans un exsiccateur sous vide phosphorique puis pèse.

Le mélange des lipides après pesée est solubilisé dans une trentaine de ml de chloroforme. On transvase dans une fiole jaugée et complète le volume à 50 ml au moyen du même solvant.

Sur cette solution on prélève 10 ml pour le dosage de l'azote total et 10 ml pour le dosage du phosphore total.

B) Fractionnement

Les 30 ml qui restent sont utilisés pour le fractionnement des phospholipides. On les introduit dans un grand bécher dans lequel on verse lentement et en agitant 200 ml de méthanol. Il apparaît lentement un léger précipité floconneux qui dépose peu à peu. On abandonne pendant trois quarts d'heure puis centrifuge le mélange dans un tube taré. Le surnageant est récupéré et le précipité lavé à deux reprises avec quelques ml de méthanol. Le précipité est séché par un court séjour à l'étuve puis mis sous vide phosphorique avant d'être pesé. Nous désignons ce précipité sous le nom de précipité A.

Le surnageant de la centrifugation précédente est additionné progressivement de 350 ml de méthanol dans un grand bécher. On couvre et abandonne pendant 3 jours à l'obscurité à la température du laboratoire. Au bout de ce délai on constate qu'un nouveau précipité s'est rassemblé à la partie inférieure du solvant. Ce précipité est recueilli, séché et pesé comme pour la fraction A. Ce second précipité représente la fraction B. Les deux précipités A et B sont solubilisés séparément dans 50 ml de chloroforme. Les solutions chloroformiques seront utilisées pour les diverses déterminations analytiques. Dix ml servent pour le dosage du phosphore total, 10 ml pour celui de l'azote total. Le reste est utilisé pour la recherche et le dosage de l'inositol, la recherche chromatographique des glucides, des amino-alcools et la caractérisation du glycérol.

Techniques analytiques

Détermination du phosphore total

Le phosphore total est dosé par la méthode de BRIGGS-DENIGES (21) après minéralisation sulfo-nitro-perchlorique.

10 ml de solution à doser sont introduits dans une fiole de Kjeldahl. On évapore le chloroforme en immergeant la fiole dans le bain-marie bouillant. Lorsque tout le solvant est chassé, on introduit 1 ml d'acide sulfurique et 2 ml d'acide nitrique additionné de VI gouttes d'acide perchlorique à 65 p.cent pour le dosage des précipités A et B. Pour la détermination du phosphore lipidique total on utilise des quantités de réactifs acides cinq fois plus fortes. On chauffe jusqu'à décoloration totale. Après refroidissement on dilue à l'eau distillée et plonge la fiole une demi heure dans un bain-marie bouillant (hydrolyse des polyphosphates). On transvase ensuite dans une fiole jaugée et l'on complète à 10 ou 50 ml avec de l'eau distillée suivant qu'il s'agit du phosphore des précipités ou du phosphore total. Une partie aliquote de la solution est utilisée pour la détermination colorimétrique : addition à la solution acide d'une solution sulfurique de molybdate d'ammonium et réduction en complexe céruléomolybdique bleu par le mélange bisulfite-hydroquinone.

Détermination de l'azote total lipidique

10 ml de la solution à doser sont évaporés dans le matras de Kjeldahl comme précédemment. On minéralise par 2 ml

ou 5 ml d'acide sulfurique (suivant qu'il s'agit des précipités ou des lipides totaux) en présence d'un peu de catalyseur de Boivin (mélangesà parties égales de sulfate de cuivre, sulfate de potassium et oxyde jaune de mercure). Après décolorationdu mélange on laisse refroidir, dilue avec de l'eau distillée et transvase dans un appareil de Pregl. L'ammoniaque déplacée par la soude est titréepar l'acide sulfurique N/100 en présence de l'indicateur mixte rouge de méthyle - bleu de méthylène.

Recherche et Détermination de l'inositol

I°- Recherche sur les précipités A et B

Dans un tube à centrifuger on évapore 10 ml de solution chloroformique des précipités. On ajoute 5 ml d'acide chlorhydrique 6 N. Le tube surmonté d'un réfrigérant à reflux est plongé pendant 1 heure dans un bain-marie bouillant. Après refroidissement le contenu du tube est filtré sur papier pour éliminer les acides gras. Le filtrat qui renferme l'inositol libéré par hydrolyse est divisé en deux fractions: l'une : 2 ml, servira à caractériser le glycérol, le reste est soumis au traitement suivant. On évapore la solution au bain-marie bouillant jusqu'à résidu sec. On reprend par 10 ml d'eau distillée, on ajoute de l'ammoniaque jusqu'à début d'alcalinité. On évapore à nouveau à sec. Le résidu est solubilisé dans 10 ml d'eau distillée. On procède alors à la dé-

sionisation. La solution est transvasée dans un tube à centrifuger dans lequel on ajoute 10 ml d'un mélange humide à parties égales de résines Permutite 50 (en cycle hydrogène) et Déacidite 300 (en cycle OH^-). Le tube est agité pendant une dizaine de minutes. On centrifuge, filtre le surnageant puis lave les résines à cinq reprises avec 5 ml d'eau distillée. Les eaux de lavage filtrées sont ajoutées au surnageant. La solution est évaporée à sec au bain-marie bouillant. Le résidu sec est repris par 0,10 ml d'eau distillée. Cette solution est soumise à une chromatographie descendante selon la technique de MALANGEAU (102) : papier Arches 1030, solvant méthanol 90, eau 10 V/V, durée du développement 90 minutes à la température de 20°-22°. La révélation est réalisée par la réaction de Scherer telle qu'elle a été codifiée par MALANGEAU.

2°- Détermination de l'Inositol

Une prise d'essai de 10 ml de solution chloroformique est traitée comme dans le paragraphe précédent mais au lieu de dissoudre le résidu final dans 0,10 ml d'eau, on solubilise dans 2 ml d'eau distillée. La solution est stérilisée et l'inositol qu'elle renferme est apprécié par la technique microbiologique au Neurospora crassa.

Recherche du glycérol

Elle est effectuée sur la fraction prélevée au cours

d'une opération précédente ainsi qu'il a été indiqué. La caractérisation est basée sur la transformation du glycérol en méthylglyoxal, lequel par sa fonction aldéhyde se prête à des réactions de condensation avec les phénols engendrant des dérivés colorés, DENIGES (56). La solution renfermant le glycérol est traitée par l'eau de brome au bain-marie bouillant jusqu'à élimination totale de l'halogène. La dihydroxyacétone qui a pris naissance au cours de l'oxydation est déshydratée par chauffage avec l'acide sulfurique concentré en présence d'un dérivé phénolique (résorcine, acide salicylique, codéine). En présence de glycérol, il se développe des colorations permettant de déceler quelques dizaines de µg de ce trialcool (résorcine : rouge ; acide salicylique : violacé ; codéine : bleu vert).

Recherche chromatographique des glucides

Cette recherche est effectuée sur le résidu d'évaporation des solutions chloroformiques des précipités A et B après hydrolyse de 1 h 30 par l'acide chlorhydrique 2 N à la température du bain-marie bouillant. Lorsque l'hydrolyse est terminée, la solution refroidie est désionisée et traitée suivant la technique proposée par FLEURY, MALANGEAU et EBERHARD (75) pour la caractérisation des glucides urinaires. L'hydrolysat est désionisé par agitation dans un tube à centrifuger contenant de la résine cationique Permo C_{50} et de la

résine amionique Permo A 240. activées. Cette dernière résine faiblement alcaline ne provoque ni dégradation ni épimérisation des oses. Après cinq minutes d'agitation on centrifuge, récupère le surnageant et lave les résines avec trois fois 5 ml d'eau distillée. Les eaux de lavage sont jointes au surnageant. Le liquide est évaporé à sec au bain-marie bouillant et le résidu est repris par 0,10 ml d'eau distillée.

La solution obtenue est soumise :

a) à une chromatographie circulaire selon le protocole de FLEURY, MALANGEAU, EBERHARD : Développement sur papier Arches 304 pendant 16 heures entre 20° et 22° au moyen du solvant n.butanol, pyridine, eau distillée V/V 9.5.2. puis révélation par le réactif Thymol-(b-naphtylamine.

b) à une chromatographie descendante de 36 heures sur papier Whatman n°1 au moyen du solvant : n.butanol, pyridine, eau V/V 9.5.4. Un premier chromatogramme est révélé par le réactif thymol-(b-naphtylamine, un autre subit la pulvérisation des réactifs à l'acétylacétone et au para-diméthylaminobenzaldéhyde de la réaction d'Elson-Morgan spécifique des osamines et appliquée à la chromatographie par PARTRIDGE (111).

Recherche chromatographique des amino-alcools

Nous la réalisons sur un extrait chloroformique préparé comme pour la chromatographie des sucres à cette différence que l'hydrolyse est effectuée au moyen d'acide chlorhydrique 6 N.

On effectue une chromatographie descendante de 18 heures sur papier Whatman n°2 au moyen du solvant de Partridge : n.butanol, acide acétique, eau V/V : 4.1.5. Une autre expérience est réalisée en utilisant le solvant n.butanol, pyridine, eau V/V 9.5.4. en chromatographie descendante de 48 heures. On révèle par la ninhydrine à 2 p.1000 dans le butanol.

Résultats

Les résultats que nous présentons dans le tableau XIV correspondent à la moyenne de trois analyses de farine du même lot de graines de Sorgho Fela blanc. Les faibles quantités de phospholipides obtenues au cours du fractionnement ne nous ont pas permis certaines déterminations quantitatives en raison de la multiplicité des examens effectués sur chacune d'elles, c'est ainsi que les amino-alcools, les glucides et le glycérol ont seulement fait l'objet d'une identification qualitative.

Tableau XIV

Composition de l'extrait lipidique de graines de Sorgho Fela blanc pour 100 g de graines	
Lipides totaux	2,70 g
Fraction A alcoolo insoluble	0,085 g
Fraction B alcoolo insoluble	0,029 g
Phosphore lipidique	5,25 mg
Phosphore de la fraction A	1,57 mg
Phosphore de la fraction B	1,14 mg
Azote total lipidique	2,14 mg
Azote de la fraction A	0,75 mg
Azote de la fraction B	1,02 mg
Inositol de la fraction A	0,016 mg
Inositol de la fraction B	0,113 mg

Discussion

I°- Phosphore lipidique

La richesse en lipides des graines de Sorgho de diverses variétés a déjà été examinée par divers auteurs. ADRIAN (1) (2) indique des teneurs oscillant entre 2,25 et 4,55 g pour 100 g de graines, qu'il s'agisse de ses propres résultats ou de ceux relevés dans la littérature. GUERRANT (79) (80), non cité par ADRIAN, a étudié 7 variétés de Sorgho et estime que la teneur en lipides est comprise entre 2,36 g et 3,37 g.

Les graines de Sorgho Fela blanc nous ont permis d'extraire 2,70 g de lipides totaux, valeur qui cadre bien avec les données antérieures concernant d'autres variétés.

Nous évaluons le phosphore lipidique total à 5,25 mg pour 100 g de graines ce qui représente 1,44 p.cent du phosphore total (P total = 366 mg).

GUERRANT admet des teneurs fort différentes : pour une teneur en phosphore total de 245 mg, cet auteur trouve 38 mg de phosphore lipidique, ce qui permet de chiffrer le phosphore lipidique à 15,5 p.cent du phosphore total, valeur deux fois supérieure à celle que l'on admet pour la graine de Soja qui se classe parmi les plus riches en phospholipides. Ces valeurs très élevées s'expliquent à notre avis par le mode opératoire suivi par GUERRANT. En effet cet auteur réalise une simple extraction des graines à froid par un mélange éthanol : 4 éther : 1 V/V et dose le phosphore après minéralisation du surnageant de centrifugation. Nous pensons qu'en raison de sa richesse en éthanol le solvant doit entraîner une certaine quantité de phosphore non lipidique.

Dans notre protocole d'extraction, l'extrait lipidique méthanolo-chloroformique est repris par l'éther de pétrole. Ce solvant selon LOVERN (98) permet une purification qui élimine une partie importante des substances contaminantes entraînées par le premier mélange solvant.

Les phospholipidiques alcoolo-insolubles des précipités

A et B évalués par gravimétrie représentent respectivement 85 mg et 29 mg pour 100 g de graines. La fraction de phosphore des phospholipides alcoolo-solubles déterminée par différence peut aussi être estimée en se basant sur le coefficient de transformation du phosphore lipidique en poids de phospholipides. Le coefficient habituellement admis est de 25 en considérant qu'un phospho-amino-lipide simple renferme à peu près 4 p.cent de son poids de phosphore.

On aura ainsi les valeurs approximatives suivantes pour 100 g de graines :

Phospholipides totaux	5,25 x 25	=	131 mg
Phospholipides A	1,57 x 25	=	39,2 mg
Phospholipides B	1,14 x 25	=	28,5 mg
Phospholipides alcoolo-solubles			63,3 mg

La valeur des phospholipides totaux de 100 g de graines calculée d'après les données de GUERRANT est considérablement plus élevée. Ce chercheur estime les lipides totaux à 2,98 g et le phosphore lipidique à 38 mg ce qui représente 950 mg de phospholipides en adoptant le coefficient de 25. Ce taux de phospholipides correspond à 32 p.cent des lipides totaux ce qui nous semble très au-dessus des teneurs signalées dans les mémoires pour les graines de Graminées.

2°- Azote

La détermination de l'azote s'est révélée assez délicate car l'alcool méthylique, même redistillé sur potasse puis acide

orthophosphorique qui retient les dérivés ammoniacaux ou les amines volatiles, apporte en effet une petite quantité de substances alcalines consommant de l'acide sulfurique N/100 lors du titrage à la sortie de l'appareil de Pregl. Il a été tenu compte de ce léger excès d'azote ammoniacal que nous avons pu apprécier en effectuant des témoins au moyen d'alcool méthylique soumis à la minéralisation.

L'azote des phospholipides et des lipides totaux permet d'établir les rapports P/N des divers échantillons. Ces rapports atomiques sont les suivants :

Lipides totaux	P/N = 1,1
Fraction A	P/N = 0,95
Fraction B	P/N = 0,45

On sait que dans les phospho-amino-lipides renfermant de la choline, de l'éthanol-amine ou de la sérine le rapport est égal à 1. Il est au contraire de 0,50 dans les sphingomyélines qui contiennent deux atomes d'azote (sphingosine + choline) par molécule renfermant un atome de phosphore. Il en est de même dans le cas du phytoglycolipide à inositol de H. CARTER qui contient une molécule de phytosphingosine et une molécule de glucosamine pour un reste d'acide phosphorique.

Le rapport P/N permet de mieux se rendre compte de la composition des fractions. En effet on peut constater qu'il existe une différence sensible entre les poids de fraction A et B établis par pesée et ceux qui sont calculés en multipliant

leur teneur en phosphore par 25. La fraction A apparaît moins pure que la fraction B pour laquelle les valeurs déterminées par pesée et par calcul sont très proches. La difficulté d'obtenir des fractions de phospholipides pures est reconnue par tous les auteurs : LOVERN (98), WITTCOFF (136), HANAHAN (83). Les phospholipides ont la remarquable propriété de solubiliser de nombreuses substances non lipidiques : amino-acides, sucres, stérols, substances minérales. Celles-ci contaminent les précipités lors des opérations de fractionnement. A l'heure actuelle, la chromatographie sur colonne ou l'extraction à contre-courant permettent de pousser assez loin la purification, car il ne faut pas oublier qu'"un phospholipide" est en réalité une association de molécules différant par leurs acides gras (84).

3°- Inositol

La chromatographie sur papier a montré l'absence d'inositol dans les précipités non hydrolysés. Après hydrolyse, les fractions A et B fournissent une seule tache de cyclitol. La vitesse de migration de ce dernier est identique à celle du méso-inositol témoin. La tache correspondant au précipité A est beaucoup plus faible que celle obtenue avec B. La détermination quantitative par le test au Neurospora crassa permet d'affirmer qu'il s'agit bien du méso-inositol.

Le précipité A en renferme 0,019 p.100 et le précipité B 0,39 p.100.

Si pour se faire une idée de la quantité possible d'inositophosphatide de ces fractions on suppose que l'on a affaire à un phosphatidyl inositol très simple (1 molécule de glycérol, 2 molécules d'acides gras, 1 molécule d'acide phosphorique et une molécule d'inositol) ;on peut adopter pour ce corps le poids moléculaire moyen de 800. Les quantités d'inositol des fractions correspondront alors à :

Fraction A : 0,071 mg d'inositophosphatide

Fraction B : 0,500 mg d'inositophosphatide

ce qui ne représente qu'une faible part des phospholipides de chaque fraction. On pourra remarquer que la fraction la plus riche en inositol précipite au cours de la deuxième phase de fractionnement alors que théoriquement on devrait la rencontrer dans la première fraction. Il est possible que des phénomènes de solubilité réciproque et de coprécipitation soient responsables de cette anomalie, étant donné la faible teneur en inositophosphatides. La fraction B la plus riche en contient 1,7 p.cent. Les traces présentes dans A correspondent probablement à la même substance que celle décelée dans B.

4°- Autres constituants

La présence de glycérol attestée par la positivité des réactions de Denigès indique que les deux fractions renferment des glycérophosphatides.

La chromatographie des sucres par deux techniques utilisant des solvants différents permet après révélation de dé-

celer une seule tache, située entre celles du glucose et du galactose témoins. La présence de glucose dans les fractions de phospholipides est signalée par divers auteurs : LOVERN (99); il provient le plus souvent d'une association glucose-phosphatides. La galactose quand il est présent résulte en général de l'hydrolyse de cérébrosides entraînés au cours du fractionnement. Nous n'avons pu dans nos premiers essais opter pour l'un ou l'autre de ces aldoses. Des chromatographies de 48 heures développées avec le solvant pyridinique cité plus haut nous ont finalement permis de conclure à la présence très vraisemblable de glucose.

La négativité de la réaction d'Elson-Morgan exclut la présence d'osamines. Il était nécessaire de pratiquer cette réaction car la glucosamine migre en milieu acide comme la sérine et se révèle également par la ninhydrine.

La révélation des chromatogrammes d'amino-alcools développés au moyen d'un solvant acide et d'un solvant alcalin ne fournit que deux taches très nettes. La plus intense se place à la hauteur de la sérine témoin, l'autre moins accentuée migre comme l'éthanol-amine témoin. Sur certains chromatogrammes on peut distinguer entre les deux taches précédentes une tache faiblement colorée mais bien délimitée. Son identification reste à préciser. La présence de la sérine et de l'éthanol-amine nous permet de déduire que les deux fractions A et B renferment une quantité importante de phosphatidyl-

sérine et une quantité moindre de phosphatidyl-éthanol amine.

Conclusion

Le phosphore lipidique des graines de Sorgho ne figure que pour une faible part dans le pourcentage du phosphore total. Nous n'avons pas tenté la comparaison avec d'autres graines de Graminées, de Légumineuses ou de diverses espèces oléagineuses, WEISS (134) car les données de la littérature pour une même graine sont souvent fort discordantes. Le procédé d'extraction a une importahce considérable sur le rendement en lipides : expression, utilisation des solvants à froid ou à chaud. Nous avons pu rencontrer au cours de nos recherches bibliographiques des valeurs du taux de lipides ou de phospholipides qui pour une même graine variaient dans le rapport de 1 à 5. A cela s'ajoute souvent une imprécision relative au mode d'expression des résultats : l'auteur ne précise pas toujours si ses valeurs représentent du phosphore, de l'anhydride phosphorique ou de l'acide orthophosphorique. Il arrive aussi parfois qu'on hésite pour savoir si le taux de phospholipides est rapporté à 100 g de graines ou de lipides totaux.

Dans le cadre de notre étude des graines de Sorgho Fela blanc, on peut constater que le taux de phospholipides est relativement faible par rapport à celui des lipides totaux. La phosphatidyl-sérine et la phosphatidyl-éthanol-amine semblent en constituer les principaux composants. La présence d'une faible quantité d'un ou plusieurs phospholipides à ino-

sitol paraît certaine.

Les difficultés de séparation des phospholipides entre eux n'ont pas permis dans ce travail d'orientation de pousser plus avant l'étude de la fraction à inositol. Nous espérons poursuivre l'examen du constituant à inositol en partant de quantités plus importantes de matière première et en utilisant des techniques de fractionnement choisies pour leur sélectivité.

-:-

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

-:-

Au cours de ce travail nous avons envisagé quelques aspects de la biochimie des graines du genre Sorghum qui constituent la base de la ration alimentaire de la population noire d'Afrique occidentale.

Dans une première partie nous avons examiné la teneur en phosphore total, phosphore acido-soluble et phosphore phytique de 7 espèces ou variétés de graines de Sorgho et aussi de 5 variétés de graines de Mils du Sénégal. Nous avons pu montrer que, comme chez la plupart des Graminées alimentaires, le phosphore phytique représente la majeure partie du phosphore acido-soluble et du phosphore total. Suivant les échantillons, la teneur en phosphore phytique est comprise entre 45,5 et 93,5 p.cent du phosphore total. Chez les autres Graminées étudiées par divers auteurs, on rencontre également des écarts aussi marqués. Le contenu en calcium et magnésium des graines de Sorghos et Mils a été déterminé. Le but de cette recherche était de savoir si ces cations étaient ou non excédentaires par rapport à l'acide phytique. Cette question est importante

puisqu'on reconnaît à l'acide phytique des propriétés insolubilisantes vis-à-vis de nombreux cations : calcium, magnésium, fer, cuivre, zinc. Le blocage du calcium et du fer dans les régimes trop riches en acide phytique provoque le rachitisme ou des carences martiales. Nous avons pu constater un léger excès de calcium et de magnésium par rapport à l'acide phytique. Ce faible surplus expliquerait peut être la rareté des carences calciques au Sénégal lorsque le Sorgho et le Mil ne constituent pas l'unique aliment.

Dans la seconde partie de notre travail nous avons procédé à l'examen de quelques propriétés enzymatiques des graines de Sorghos et Mils. Notre attention a été plus particulièrement orientée vers les activités glycérophosphatasique et phytasique. Toutes les graines étudiées se caractérisent par une activité glycérophosphatasique importante qui contraste avec l'absence quasi-totale d'activité phytasique. Sur ce point, le Mil et le Sorgho se rapprochent de l'Avoine.

La germination entraîne une exaltation de l'activité glycérophosphatasique et l'apparition de l'activité phytasique.

Nous avons tenté de démasquer l'activité phytasique des graines non germées en soumettant les extraits enzymatiques à une protéolyse partielle destinée à libérer éventuellement l'enzyme d'un complexe protéique inactif. Ces essais ont été infructueux.

Nous avons alors repris une hypothèse de COURTOIS. Cet auteur a supposé que la phytase est une phosphatase de faible poids moléculaire susceptible de s'unir à l'acide phytique pour former une combinaison stable et dépourvue d'activité enzymatique. Partant de cette idée nous avons procédé à des mesures de l'activité phytasique en utilisant de très faibles concentrations de substrat afin d'essayer de rendre difficile la combinaison phytase-acide phytique.

Dans ce but nous avons dû purifier des extraits enzymatiques de graines considérées comme pratiquement dépourvues d'activité phytasique : Sorgho, Avoine, Dactyle. Cette purification était destinée à éliminer l'acide phytique associé aux protéines dans la graine. Au moyen de ces préparations enzymatiques purifiées nous avons pu mettre en évidence les faits suivants.

I°- Lorsqu'on oppose des doses constantes d'enzyme à des doses très faibles de substrat ajoutées progressivement dans le temps, l'hydrolyse n'est totale que pour les premières fractions d'acide phytique ajouté. Dès que la concentration en substrat atteint un certain taux le pourcentage d'hydrolyse s'abaisse rapidement. Dans les mêmes conditions l'hydrolyse du glycérophosphate se poursuit quelle que soit la concentration.

2°- Si on oppose à des doses constantes d'enzyme des doses croissantes de substrats de M/5000 à M/100 (en $H_3 PO_4$

estérifié), l'hydrolyse ne se produit que pour les très faibles concentrations en substrat. Au contraire, le glycérophosphate est toujours hydrolysé de façon notable.

De ces deux protocoles expérimentaux nous pouvons déduire que tout se passe comme si la phytase s'unissait à l'acide phytique pour donner une combinaison stable et inactive dès que la concentration en acide phytique atteint une certaine valeur.

Un bref examen de deux autres activités enzymatiques a été effectué. Le Sorgho germé étant utilisé pour fabriquer une sorte de bière, nous avons pu apprécier l'activité amylasique des graines germées. Bien que seul le Sorgho soit utilisé par les indigènes pour préparer des boissons alcooliques, les Mils et Sorghos germés présentent une forte activité amylasique du même ordre de grandeur. Tous les échantillons de Sorgho germé possèdent une activité β glucosidasique s'objectivant par l'hydrolyse d'un hétéroside cyanogénétique des jeunes pousses : le durrhoside. L'activité β glucosidasique est décelable dans les graines de Mil et de Sorgho avant germination, mais chez le Sorgho la germination donne naissance à l'hétéroside.

Dans une troisième partie, nous avons essayé de suivre les variations des constituants phosphorés et de l'inositol au cours de la germination. Nous avons procédé au fractionne-

ment en 3 groupes des dérivés phosphorés acido-solubles des graines avant et après germination. La séparation par la technique basée sur les solubilités des sels de baryum des divers constituants phosphorés est délicate, elle ne permet pas une récupération quantitative. Il est possible que l'alternance des traitements par les acides et les alcalis entraîne une hydrolyse de certains esters particulièrement acido - ou alcalino-labiles, ce qui augmenterait en définitive la teneur apparente en phosphore minéral. La germination s'accompagne d'une baisse du taux de phosphore phytique et d'une hausse du phosphore minéral, mais l'accroissement de ce dernier ne peut provenir uniquement du clivage de l'acide phytique. La graine germée contient davantage d'inositol libre que la graine en dormance, mais la somme de l'inositol libre et de l'inositol phytique est plus faible dans la graine germée que dans la graine au repos. Cette diminution doit résulter d'une utilisation de l'inositol pour les besoins de croissance de la plantule.

Dans la dernière partie, après avoir déterminé la teneur en lipides totaux et en phospholipides de la graine, nous avons réalisé un fractionnement partiel de ces phospholipides. A côté de la fraction céphalinique qui renferme vraisemblablement surtout de la phosphatidyl-sérine et un peu de phosphatidyl-éthanol-amine, nous avons pu déceler une fraction phospholipidique qui contient de l'inositol. Le Sorgho se rap-

proche à ce titre de nombreuses autres graines dans lesquelles il a été possible au cours des dernières années de mettre en évidence l'existence d'inosito-phosphatides. Nous avons seulement ébauché cette étude, il est encore prématuré d'envisager sur nos échantillons de phosphatides la détermination de la composition et l'établissement de la structure. La purification poussée entreprise sur des quantités plus importantes que celles dont nous disposons actuellement nous permettra peut-être de préciser la nature de cette fraction inosito-phosphatidique.

-:-

BIBLIOGRAPHIE

-:-

1 - ADRIAN (J.) - Les plantes alimentaires de l'Ouest africain. 1) Les Mils et les Sorghos -
Direction générale de la Santé Publique, Dakar 1954

2 - ADRIAN (J.) et SAYERSE (Ch.) - Les plantes alimentaires de l'Ouest africain. II) Composition des Mils et Sorghos du Sénégal.
Direction générale de la Santé Publique, Dakar 1954

3 - ALBAUM (H.G.) et UMBREIT (W.W.) - Amer.J. Bot. 1943, 50, 553

4 - ANAGNOSTOPOULOS (C.) et LINO (A.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1957, 39, 781

5 - BAILEY (C.H)- The constituents of wheat and wheat products. Reinhold Ed. New-York 1944

6 - BARRE (R.) et COURTOIS (J.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1949, 31, 740

7 - BARRE (R.) - Thèse Doct. Sc. Paris 1953

8 - BARRE (R.) et COURTOIS (J.E.) - Ann. Pharm. Franç. 1953, 11, 653

9 - BARRE (R.) et COURTOIS (J.E.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1953, 35, 913

10 - BARRE (R.) et COURTOIS (J.E.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1953 35 921

11 - BARRE (R.), COURTOIS (J.E.), DELRIEU (P.) et PERLES (R.) Ann. Biol. Clin. 1954 12 501

12 - BARRE (R.), COURTOIS (J.E.), DELRIEU (P.) et PERLES (R.) Ann. Pharm. Franç. 1954 12 601

13 - BARRE (R.), COURTOIS (J.E.) et WORMSER (G.) Bull. Soc. Chim. Biol. 1954 36 455

14 - BARRE (R.), COURTOIS (J.E.), DELRIEU (P.) et PERLES (R.) Ann. Biol. Clin. 1955 13 264

15 - BARRE (R.), COURTOIS (J.E.) et WORMSER (G.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1956 38 387

16 - BARRE (R.) et LABAT (J.) - Ann. Biol. Clin. 1960 18 409

17 - BARRE (R.) et LABAT (J.) - Ann. Biol. Clin. 1960 18 422

18 - BERTRAND (D.) - Répartition du phosphore chez les végétaux supérieurs in : Le phosphore et son rôle en biologie. p.79. Presses Univ. France, Paris 1949

19 - BETZ (J.D.) et NOLL (C.A.) - J. Amer. Water Works. Assoc. 1950 42 49

20 - BIGWOOD (E.J.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1951 33 1261

21 - BRIGGS (A.P.) - J. Biol. Chem. 1924 59 255

22 - BROHULT (S.) et SANDEGREN (E.) - Seed Proteins in : Neurath (H.) et Bailey (K.) The Proteins vol.II A p.487. Acad. Press. New York 1954

23 - BROWN (J.R.) et SERRO (R.F.) - J. Amer. Chem. Soc. 1953 75 1040

24 - BRUCE (I.C.L.), GILES (C.H.) et JAIN (S.K.) - J. Chem. Soc. 1958 1610

25 - BURKHOLDER (P.) - Science 1943 97 562

26 - BURKHOLDER (P.), MOYER (D.) - Bull. Torrey Club 1943 70 372

27 - COLAS (M.C.) - Thèse Doct. Pharm. (Etat) Paris 1959

28 - COLIN (Y.) - Thèse Doct. Sc. Paris 1935

29 - COPAUX (H.)- C.R. Ac. Sci. 1921 173 656

30 - COURTOIS (J.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1945 27 411

31 - COURTOIS (J.) - Biochim. Biophys. Acta 1947 1 270

32 - COURTOIS (J.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1947 29 944

33 - COURTOIS (J.) et JOSEPH (G.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1947 29 951

34 - COURTOIS (J.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1948 30 37

35 - COURTOIS (J.) et JOSEPH (G.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1948 30 610

36 - COURTOIS (J.) et PEREZ (Ch.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1948 30 195

37 - COURTOIS (J.) et PEREZ (Ch.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1948 30 631

38 - COURTOIS (J.) et PEREZ (Ch.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1949 31 1220

39 - COURTOIS (J.) et PEREZ (Ch.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1949 31 1373

40 - COURTOIS (J.) - Enzymes intervenant dans le métabolisme végétal du phosphore in : Le phosphore et son rôle en biologie p.107. Presses Univ. France Paris 1949

41 - COURTOIS (J.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1951 33 1074

42 - COURTOIS (J.E.) et MANET (L.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1952 34 265

43 - COURTOIS (J.E.), DESJOBERT (A.) et FLEURENT (P.) Bull. Soc. Chim. Biol. 1952 34 691

44 - COURTOIS (J.E.) - Acide phytique et phytases. J. Japan. Biochem. Soc. 1954 26 n°2 85

45 - COURTOIS (J.E.) - Las phosphatases végétales. J. Japan. Chem. 1954 8 n°6 331

46 - COURTOIS (J.E.), HELLEU (Cl.), MALANGEAU (P.) et PERLES (R.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1956 38 1017

47 - COURTOIS (J.E.), MALANGEAU (P.) et CHABRE (J.L.) Ann. Pharm. Franç. 1959 17 561

48 - COURTOIS (J.E.) et LINO (A) - Les phosphatases des végétaux supérieurs. in : Zechmeister : Progress in the chemistry of organic natural products 1961 19 316. Springer Ed. Vienne

49 - COURTOIS (J.E.) et PERLES (R.) - Les hydrolases in Traité de Biochimie Générale, T.II, fasc.2 Masson et Cie Ed. Paris 1962 (sous presse)

50 - CRATO (E.) - Ber. Bot. Ges. 1892 10 250

51 - CREAC'H (P.V.) - Med. Trop. 1941 1 278

52 - DARBRE (A.) et NORRIS (F.W.) - Biochem. Jl. 1956 64 441

53 - DEBRIS (M.M.), COURTOIS (J.E.) et PETEK (F.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1962 44 (sous presse)

54 - DELRIEU (P.) - Thèse Doct. Pharm. (Etat) Paris 1958

55 - DEMOLON (A.) et MARQUIS (A.) - Le phosphore et la vie. Presses Univ. France, Paris 1949

56 - DENIGES (G) in DENIGES (G), CHELLE (L.) et LABAT (A.) Précis de Chimie Analytique, T.I, p.190 - Maloine Ed. Paris 1930

57 - DERIVAUX (J.) - Ann. Med. Véter. Belgique 1949 93 n°5 266

58 - DESJOBERT (A.) et PETEK (F.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1956 38 871

59 - EBEL (J.P.) - Thèse Doct. Sc. Strasbourg 1951

60 - EEGRIWE (E.)- Z. Analyt. Chem. 1937 110 22

61 - ESSERY (R.E.) - J. Inst. Brewing 1950 47 319

62 - ESSERY (R.E.) - J. Inst. Brewing 1951 48 125

63 - EULER (H.v.) et EULER (B.v.) - Z. Physiol. Chem. 1914 92 292

64 - FERRAND (M.) - Le phosphore dans les sols tropicaux in : Le phosphore et son rôle en biologie p.199. Presses Univ. France, Paris 1949

65 - FERRANDO (R.) - Le phosphore dans divers aliments des animaux domestiques in Le phosphore et son rôle en biologie, p.130, Presses Univ. France, Paris 1949

66 - FIEVET-GUINARD (Y.)- Thèse Doct.Pharm. (Univ.) Paris 1945

67 - FLEURY (P.) et LECLERC (M.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1943 25 201

68 - FLEURY (P.) et COURTOIS (J.) - Biochim. Biophys. Acta 1947 1 256

69 - FLEURY (P.), POIROT (G.) et FIEVET-GUINARD (Y.) - Ann. Pharm. Franç. 1947 5 209

70 - FLEURY (P.) - Quelques considérations sur la recherche et le dosage des inositols. Deuxièmes journées Biochimiques Franco-Suisses. Genève 1951 , p.173 - Masson et Cie Ed. Paris

71 - FLEURY (P.), COURTOIS (J.) et PERLES (R.) - Mikrochimica Acta 1951 863

72 - FLEURY (P.), PERLES (R.) et Le DIZET (L.) - Ann. Pharm. Franç. 1953 11 581

73 - FLEURY (P.), COURTOIS (J.E.), PERLES (R.) et Le DIZET (L) Bull. Soc. Chim. 1954 347

74 - FLEURY (P.) et Le DIZET (L.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1955 37 1099

75 - FLEURY (P.), MALANGEAU (P.) et EBERHARD (R.) - Ann. Biol. Clin. 1960 18 115

76 - FOLCH (J.) - J. Biol. Chem. 1942 146 35

77 - GHOSH (Jabat Jiban) - Indian J. Physiol. and allied Sciences 1952 6 102

78 - GILLIS (M.B.), KEANE (K.W.) et COLLINS (R.A.)
J. Nutrit. 1957 13 62

79 - GUERRANT (N.B.) - J. Amer. Chem. Soc. 1926 48 2185

80 - GUERRANT (N.B.) - J. Agric. Research 1927 35 1001

81 - GUILLEMET (R.) - Biol. Méd. 1946 35 88

82 - GUILLEMET (R.), JACQUOT (R.) et TREMOLIERES (J.)
Ann. Nutrit. et Alim. 1950 4 169

83 - HANAHAN (D.J.) - Lipide chemistry - John Wiley Ed. New-York 1960

84 - HAWTHORNE (J.N.) - The inositol phospholipides -
J. Lipid Research 1960 1 225

85 - HELLEU (Cl.) - Thèse Doct. Pharm. (Etat) Paris 1957

86 - HILL (R.) et TYLER (C.) - J. Agric. Sc. 1954 44 306

87 - HUBBARD (J.E.), HALL (H.H.), EARLE (F.R.)
Cereal. Chem. 1950 27 415

88- HUNG (P.P.) - Dissert. Abstr. 1961 21 1717

89 - IRANI (R.J.) et GANAPATHI (K.) - Experientia 1959 15 22

90 - JAVILLIER (M.) - Les éléments chimiques et le monde vivant. Flammarion Ed. Paris 1952

91 - JOHNS (C.O.) et BREWSTER (J.F.) - J. Biol. Chem. 1916
28 59

92 - KABAT (E.A.), Mac DONALD (D.L), BALLOU (C.E.) et
FISCHER (H.O.L) - J. Amer. Chem. Soc. 1953 75 4507

93 - KNEEN (E.) - Cereal. Chem. 1945 22 112

94 - Le BARON (F.N.) et FOLCH (J.) - J. Neurochem. 1956 1 101

95 - Le BARON (F.N.), FOLCH (J.) et ROTHLEDER (E.)
Feder Proc. 1957 16 209

96 - Le PAGE (G.A.) et UMBREIT (W.W) - J. Biol. Chem. 1943
147 263

97 - LEVA (E.) et RAPOPORT (S.) - J. Biol. Chem. 1941 141
343

98 - LOVERN (J.A.) - The Biochemistry of Lipids of biochemical
Significance. Methuen Ed. Londres 1955

99 - LOVERN (J.A.) - Phospholipids in Handbuch der Pflanzen-
physiologie 1957 7 382 Springer Ed. Berlin

100 - MAC-CANCE (R.) et WIDDOWSON (E.) - Biochem. Jl. 1935
29 2694

101 - MAC-CANCE (R.) et WIDDOWSON (E.) - Nature 1944 153 650

102 - MALANGEAU (P.) - Thèse Doct. Pharm. (Etat) Paris 1956

103 - MALANGEAU (P.), PERLES (R.) et COLAS (M.C.) -
Chimie et Biologie de l'inositol. Pathol. et Biol.
1960 8 2307

104 - MALANGEAU (P.), PERLES (R.) et BOISSY-COLAS (M.C.)
L'inositol. Bull. Soc. Sc. Hygiène Alim. 1962
(sous presse)

105 - MEADLY (G.R.W) - J. Dept. Agric. W. Austral. 1934 11
268

106 - MOLLGAARD (H.), LORENZEN (K.), HANSEN (I.G.) et
CHRISTENSEN (P.E.) - Biochem. Jl. 1946 40 589

107 - MOORE (J.H.) et TYLER (C.) - Brit. J. Nutrit. 1955 9 81

108 - MOUNFIELD (J.D.) - Biochem. Jl. 1936 30 549 et 1778 ; 1938 32 1675

109 - NEMEC (A.) - Biochem. Z. 1928 202 229

110 - O'DELL (B.L.) et SAVAGE (J.E.) - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1960 103 304

111 - PARTRIDGE (S.M.) - Biochem. Jl. 1948 42 238

112 - PEERS (F.G.) - Biochem. Jl. 1953 53 102

113 - PEREZ (Ch.) - Thèse Doct. Pharm. (Etat) Paris - 1949

114 - PEREZ (Ch.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1949 31 1229

115 - PERLES (R.) et COLAS (M.C.) - Clin. Chim. Acta 1960 5 95

116 - PERLES (R.), COLAS (M.C.) et BLAYO (M.C.) Rev. Franç. Et. Clin. et Biol. 1960 5 31

117 - PIEDALLU (A.) - Le Sorgho. Sté Ed. Geograph. marit. et colon. Paris 1923

118 - PILEGGI (V.J.) - Arch. Biochem. Biophys. 1959 80 1

119 - POHLOUDE (K.) et FABINI (R.) - Arch. Tierenährung 1951 2 71

120 - POSTERNAK (S.) - Rev. Gen. Bot. 1900 12 5 et 65 et C.R. Ac. Sci. 1903 137 202

121 - POSTERNAK (S.) et POSTERNAK (Th.) - Helv. Chim. Acta 1929 12 1165

122 - RAMACHANDRAN (S.), SIVARAMAKRISHNAN (R.) et SARMA (P.S.)
Indian J. Med. Assoc. 1956 44 193

123 - RANDOIN (L.), Le GALLIC (P.) et CAUSERET (J.)
Tables de composition des aliments.
Lanore Ed. Paris 1947

124 - RAUN (A.), CHENG (E.) et BURROUGHS (W.) -
J. Agr. Food. Chem. 1956 4 869

125 - RICAUD-MANOUVRIER (J.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1953
35 889

126 - ROBERTS (A.H.) et YUDKIN (J.) - Nature 1960 185 823

127 - ROCHE (J.) et COURTOIS (J.) - Les phosphatases in
Polonovski (M.) - Exp. Ann. Bioch. Med. 1944 4 219
Masson et Cie Ed. Paris

128 - RCSE (A.L.) - Austral Veter J. 1941 17 211

129 - SANDEGREN - J. Inst. Brewing 1948 45 200

130 - SARMA (M.L.) et GIRI (K.V.) - Ann. Biochem. Exp.Med.
1942 2 17

131 - SCHOPFER (W.H.), POSTERNAK (Th.) et BOSS (M.L.)
Rev. Intern. Vitaminol. 1948 20 121

132 - SNOWDEN (J.D.) - The cultivated races of Sorghum.
Adlard Ed. Londres 1936

133 - VIGUIER (P.) - Les Sorghos et leur culture au Soudan
français - Dakar 1947

134 - WEISS (R.) - Bull. Soc. Chim. Biol. 1952 34 471

135 - WILDMAN (S.G.) et BONNER (J.) - Arch. Biochem. Biophys.
1947 14 381

136 - WITTCOFF (H.) - The phosphatides. Reinhold. Publ. Corp. New York 1951

137 - WORMSER (G.) - Thèse Doct. Pharm. (Univ.) Paris 1955.

-:-

TABLE DES MATIERES

-:-

Pages

INTRODUCTION 1

PLAN DU TRAVAIL 4

PREMIERE PARTIE - Le phosphore des graines de Mils et de Sorghos 6

CHAPITRE I - Etude de la teneur en phosphore phytique des graines de Sorghos et de Mils 7

- Matériel 9
- Techniques 12
- Résultats et discussion 18

CHAPITRE II - Rapports entre les teneurs en calcium des gr ines de Sorghos et Mils et leur contenu en acide phytique. 24

Détermination du calcium et du magnésium des graines 27

Résultats et discussion 29

Pages

DEUXIEME PARTIE - Etude de quelques activités enzymatiques du Sorgho. Activités glycérophosphatasique et phytasique en particulier 34

CHAPITRE I - Etude des activités glycérophosphatasique et phytasique des graines de Sorghos et de Mils 35

- Généralités sur la phytase 35
- Protocole d'étude des activités glycérophosphatasique et phytasique 40
- Résultats 43
- Discussion 44

CHAPITRE II - Influence de la germination sur l'activité phytasique 47

- Protocole opératoire 49
- Résultats et discussion 51

CHAPITRE III - Démasquage de la phytase du Sorgho et de deux autres Graminées à activité phytasique minime 54

I) Essai de protéolyse limitée 54

II) Démasquage de la phytase de trois graines: Sorgho, Avoine, Dactyle par emploi de faibles concentrations en substrat 57

Développement de l'hypothèse de travail 57

Pages

Obtention des préparations enzymatiques purifiées 63

Méthodes d'étude de l'activité phytasique des graines peu actives 65

A) Hydrolyses comparées du phytate et du glycérophosphate de sodium étudiées par addition progressive de faibles quantités de substrat à des concentrations constantes d'enzyme 66

B) Influence de la concentration initiale du substrat 75

Discussion 78

CHAPITRE IV - Etude sommaire de deux autres activités enzymatiques des graines de Mils et de Sorghos : l'activité amylasique et l'activité β glucosidasique 84

I) La Bière de Sorgho 85

Détermination de l'activité amylasique des graines de Sorghos et de Mils germés

Résultats et Discussion 89

II) L'acide cyanhydrique du Sorgho germé 90

TROISIEME PARTIE - Variations de la teneur en constituants phosphorés et en inositol au cours de la germination des graines de Sorgho 95

Pages

CHAPITRE I - Etude des variations des diverses fractions phosphorées des graines de Sorgho au cours de la germination 96

Fractionnement des dérivés phosphorés acido-solubles des graines 98

Résultats et Discussion 104

CHAPITRE II - Etude des variations de l'inositol libre au cours de la germination 115

Répartition de l'inositol dans le règne végétal 116

Choix d'une méthode de dosage de l'inositol libre 118

Extraction de l'inositol libre des graines 123

Résultats et Discussion 126

QUATRIEME PARTIE - Etude de la fraction lipidique des graines de Sorgho ; mise en évidence d'un phospholipide renfermant de l'inositol 132

Propriétés et méthodes de séparation des phospholipides 135

Extraction et fractionnement des lipides des graines de Sorgho 136

Techniques analytiques 139

Résultats 144

Pages

Discussion 145

RESUME et CONCLUSIONS GENERALES 154

BIBLIOGRAPHIE 160

-:-